



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Proteómica cuantitativa “Label-Free” del tonoplasto de *Mesembryanthemum crystallinum* L. para identificación de proteínas involucradas en la respuesta a la salinidad

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

GUSTAVO MOISÉS LASTIRI PANCARDO

TUTOR PRINCIPAL

DR. OMAR PANTOJA AYALA (Instituto de Biotecnología)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. HELENA PORTA DUCOING (Instituto de Biotecnología)
DR. GUSTAVO PEDRAZA ALVA (Instituto de Biotecnología)

MÉXICO, D. F. ENERO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento a mis padres, por su entrega y apoyo incondicional; a mi familia por su paciencia; a mis amigos y compañeros de laboratorio por su tiempo en las discusiones sobre este trabajo las cuales ayudaron a enriquecerlo.

Además me gustaría agradecer al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por apoyarme para asistir al XV Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas organizado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica en 2013, al Plant Transport Meeting en Glasgow, Reino Unido en 2014 y finalmente al 5th PanAmerican Plant Membrane Biology Workshop en 2015, eventos en los cuales tuve la oportunidad de exponer mi trabajo.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1. SALINIDAD EN LOS SUELOS | 3 |
| 2. MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD A NIVEL CELULAR | 5 |
| 2.1. AJUSTE OSMÓTICO | 5 |
| 2.2. ESTRÉS OXIDATIVO | 7 |
| 2.3. TRANSPORTADORES IÓNICOS QUE REGULAN LOS NIVELES INTRACELULARES DE Na⁺ | 7 |
| 2.3.1. TRANSPORTE DE Na⁺ A TRAVÉS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA | 8 |
| 2.3.2. COMPARTIMENTALIZACIÓN DEL Na⁺ EN LA VACUOLA | 11 |
| 3. LA HALÓFITA <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L. | 14 |
| 4. PROTEÓMICA | 16 |
| 4.1. PROTEÓMICA CUANTITATIVA | 17 |
| 4.2. PROTEÓMICA CUANTITATIVA SIN MARCA (LABEL-FREE) | 18 |
| 4.2.1. CUANTIFICACIÓN POR CONTEO DE ESPECTROS | 19 |
| 4.3. BIBLIOTECA COMBINACIONAL DE LIGANDOS HEXAPEPTÍDICOS (“COMBINATORIAL HEXAPEPTIDE LIGAND LIBRARY/CPLL”) | 20 |
| ANTECEDENTES | 23 |
| HIPÓTESIS | 24 |
| OBJETIVOS | 24 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| I. OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL | 25 |
| II. MEDICIÓN DE LA OSMOLARIDAD | 25 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| III. | AISLAMIENTO DE MICROSOMAS | 26 |
| IV. | CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA | 26 |
| V. | SEPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR SDS-PAGE | 27 |
| VI. | INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS | 28 |
| VII. | TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON PLATA | 29 |
| VIII. | ELECTROFORESIS ZONAL DE FLUJO LIBRE (FFZE) | 29 |
| IX. | DISMINUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS ABUNDANTES | 30 |
| X. | PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDO TRICLOROACÉTICO | 30 |
| XI. | ESPECTROMETRÍA DE MASAS LC-MS/MS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ANÁLISIS DE BASE DE DATOS | 31 |
| XII. | ANOTACIÓN DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS | 32 |
| XIII. | CONTEO DE ESPECTROS | 33 |
| RESULTADOS | | 34 |
| 1. | CRECIMIENTO DE <i>M. crystallinum</i> Y MEDICIÓN DE LA OSMOLARIDAD DE LA SAVIA CELULAR | 34 |
| 2. | AISLAMIENTO DE MEMBRANAS MICROSOMALES DE HOJAS DE <i>M. crystallinum</i> | 37 |
| 3. | ENRIQUECIMIENTO DE TONOPLASTO DE <i>M. crystallinum</i> MEDIANTE ELECTROFORESIS ZONAL DE FLUJO LIBRE (FFZE) | 38 |
| 4. | PROTEÓMICA CUANTITATIVA SIN MARCA (LABEL-FREE) DE TONOPLASTO DE <i>M. crystallinum</i> | 42 |
| 5. | ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PROTEÍNAS CUYA ABUNDANCIA DISMINUYÓ POR LA SALINIDAD | 57 |
| 6. | ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PROTEÍNAS CUYA ABUNDANCIA AUMENTÓ POR LA SALINIDAD | 59 |
| 7. | VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS PROTEÍNAS QUE AUMENTARON SU ABUNDANCIA POR LA SALINIDAD | 67 |
| 8. | DISMINUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS | |

| | |
|---|-----|
| PROTEÍNAS ABUNDANTES EN MEMBRANAS MICROSOMALES Y TONOPLASTO DE <i>M. crystallinum</i> | 71 |
| 9. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE FRACCIONES CPLL DEL TONOPLASTO DE <i>M. crystallinum</i> | 80 |
| 10. PROTEÓMICA COMPARATIVA ENTRE LA FRACCIÓN CRUDA ENRIQUECIDA EN TONOPLASTO Y LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN EL TRATAMIENTO CPLL | 86 |
| DISCUSIÓN | 88 |
| CONCLUSIONES | 97 |
| PERSPECTIVAS | 99 |
| REFERENCIAS | 100 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Porcentaje de pérdida por estrés en los principales cultivos | 4 |
| Tabla 2. Clasificación Taxonómica de <i>M. crystallinum</i> | 15 |
| Tabla 3. Conteo de espectros de las subunidades de la V-ATPasa | 45 |
| Tabla 4. Enriquecimiento de las proteínas identificadas en base a su localización celular | 51 |
| Tabla 5. Enriquecimiento para los procesos biológicos de las proteínas identificadas | 52 |
| Tabla 6. Análisis de enriquecimiento de las proteínas identificadas en base a su localización en una membrana | 52 |
| Tabla 7. Análisis estequiométrico de las subunidades de la V-ATPasa | 53 |
| Tabla 8. Proteínas en las muestras que disminuyeron su abundancia en condiciones de salinidad | 55 |
| Tabla 9. Proteínas en las muestras que incrementaron su abundancia en condiciones de salinidad | 56 |
| Tabla 10. Número de espectros LC-MS/MS de proteínas abundantes en fracciones enriquecidas en tonoplasto de hojas de <i>M. crystallinum</i> tratadas con sal | 75 |
| Tabla 11. Proteínas de almacenamiento y de defensa identificadas en la fracción CPLL | 84 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura química de los solutos compatibles comunes | 6 |
| Figura 2. Principales mecanismos celulares involucrados en el transporte de Na ⁺ | 13 |
| Figura 3. La halófito <i>M. crystallinum</i> | 14 |
| Figura 4. Diferencia entre proteómica cuantitativa con marca y proteómica cuantitativa libre de marca | 19 |
| Figura 5. Principio de la técnica de CPLL | 22 |
| Figura 6. Morfología de Plantas de <i>M. crystallinum</i> cultivadas en invernadero | 35 |
| Figura 7. Osmolaridad en hojas y tallos de <i>M. crystallinum</i> | 36 |
| Figura 8. Análisis 1D-SDS-PAGE de membranas microsomales de <i>M. crystallinum</i> | 38 |
| Figura 9. Perfil de proteínas microsomales de plantas de <i>M. crystallinum</i> separadas en 96 fracciones mediante el sistema FFZE | 40 |
| Figura 10. Análisis 1D-SDS-PAGE e inmunoblot de las fracciones colectadas mediante FFZE | 41 |
| Figura 11. Distribución de las proteínas identificadas mediante análisis LC-MS/MS en las fracciones colectadas enriquecidas en tonoplasto | 43 |
| Figura 12. Localización subcelular de las proteínas identificadas y de los espectros contados | 44 |
| Figura 13. Procesos biológicos en los que participan las proteínas identificadas y los espectros contados | 47 |
| Figura 14. Clasificación de las proteínas identificadas y de los espectros contados en base a la presencia de posibles dominios transmembranales | 49 |
| Figura 15. Procesos biológicos en los que participan las proteínas cuya abundancia disminuyó en respuesta a la salinidad y los espectros correspondientes a estas proteínas | 58 |
| Figura 16. Localización subcelular de las proteínas que disminuyeron su abundancia en respuesta a la salinidad y los espectros asociados a estas proteínas | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Localización en base a posibles dominios transmembranales de las proteínas cuya abundancia disminuyó por la salinidad y los espectros asociados a estas proteínas | 60 |
| Figura 18. Procesos biológicos en los que participan las proteínas que aumentaron su abundancia en respuesta a la salinidad y los espectros contados de estas proteínas | 61 |
| Figura 19. Localización subcelular de las proteínas que aumentaron su abundancia en respuesta a la salinidad y los espectros contados de estas proteínas | 62 |
| Figura 20. Localización de las proteínas que aumentaron su abundancia en base a posibles dominios transmembranales y los espectros contados para estas proteínas | 63 |
| Figura 21. Análisis de dominios de tres proteínas cuya abundancia aumentó por la salinidad | 66 |
| Figura 22. Mapa de interacciones de las proteínas DnaJ y VPS29 | 67 |
| Figura 23. Análisis de la abundancia de tres subunidades de la V-ATPasa por Western Blot (WB) | 69 |
| Figura 24. Análisis de la abundancia de dos subunidades del retrómero por WB | 70 |
| Figura 25. Análisis de la abundancia de la PEPC por WB | 71 |
| Figura 26. Tratamiento de extracto crudo de microsomas de hojas de plantas tratadas con 200 mM NaCl con CPLL | 73 |
| Figura 27. Análisis de las fracciones colectadas de la columna CPLL por WB | 76 |
| Figura 28. Tratamiento con CPLL de fracciones puras de tonoplasto de hojas de plantas de <i>M. crystallinum</i> tratadas con 200 mM NaCl | 78 |
| Figura 29. Análisis WB de las fracciones de tonoplasto colectados de la columna CPLL | 79 |
| Figura 30. Distribución de las proteínas aisladas con la biblioteca CPLL e identificadas por LC-MS/MS para cada condición experimental | 81 |
| Figura 31. Procesos biológicos y localización de las proteínas identificadas en las fracciones CPLL | 82 |

| | |
|--|----|
| Figura 32. Distribución de las proteínas identificadas en las diferentes fracciones y condiciones del tratamiento CPLL | 85 |
| Figura 33. Distribución de las 47 proteínas identificadas exclusivas de la fracción FT en base a su posible localización en alguna membrana | 86 |
| Figura 34. Distribución de las proteínas identificadas en la fracción cruda enriquecida en tonoplasto y las fracciones tratadas con CPLL | 87 |

RESUMEN

La planta *Mesembryanthemum crystallinum* L., es una planta modelo para el estudio de la tolerancia al estrés salino. Esta halófito puede acumular hasta 1 M de NaCl en el tejido aéreo, la mayor parte del cual se almacena en la gran vacuola central presente en las células vejiga de la hoja y los tallos. La acumulación vacuolar de Na⁺ se cree que está mediado por intercambiadores Na⁺/H⁺, energizados por la H⁺-ATPasa vacuolar (V-ATPasa), sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos moleculares implicados en el transporte de Na⁺ a través de la membrana de la vacuola (tonoplasto) y cómo éstos son regulados. Con el fin de identificar proteínas de membrana involucradas en la respuesta a la salinidad, además de posibles mecanismos reguladores, se obtuvieron fracciones enriquecidas en tonoplasto de la hoja por la técnica de Electroforesis Zonal de Flujo Libre y se analizaron por LC-MS/MS sin marcaje para la cuantificación de proteínas mediante conteo de espectros. Este enfoque es adecuado para el estudio de proteínas de membrana, que son difíciles de resolver en geles, ya que disminuye las limitantes asociadas con el etiquetado de proteínas y aumenta el número de proteínas que se pueden comparar cuantitativamente. En total se identificaron 530 proteínas de las cuales 37, principalmente localizadas en el cloroplasto y el complejo ER-Golgi, disminuyeron su abundancia con la salinidad. En contraste, 17 proteínas aumentaron su abundancia, entre ellas cuatro subunidades de la V-ATPasa, cuatro enzimas glicolíticas, así como varias implicadas en el tráfico vesicular, entre los que se encuentran componentes del retrómero y de la vía de señalización por fosfoinosítidos. Estos descubrimientos llevan a replantearse la idea clásica que se tiene sobre el transporte de Na⁺ al interior de la vacuola. Además, para identificar proteínas de muy baja abundancia que representan la mayoría de las especies de proteína en cualquier proteoma, se empleó una Biblioteca Combinacional de Ligandos Hexapeptídicos, lo que permitió ampliar el número de proteínas identificadas inicialmente en un 14%, resultando en la identificación de proteínas de almacenamiento y de defensa en plantas tratadas con sal, mientras que ayudó al aislamiento selectivo de proteínas de membrana.

INTRODUCCIÓN

Frecuentemente las plantas están expuestas a diversas condiciones de estrés, las cuales afectan de manera negativa su desarrollo, crecimiento y productividad agrícola (Rhoades & Loveday, 1990).

Las condiciones de estrés pueden ser de dos clases:

- **Biótico:** el cual es provocado por otros organismos.
- **Abiótico:** causado por condiciones desfavorables en el ambiente físico o químico.

Entre las condiciones de estrés abiótico más frecuentes y que causan efectos negativos en las plantas se encuentran las inundaciones, la sequía, las fluctuaciones extremas de temperatura, la excesiva salinidad en el suelo y la falta de nutrientes (Buchanan *et al.*, 2006).

Como consecuencia del estrés, en la planta se generan una serie de respuestas muy variadas que van desde alteraciones en la expresión genética, hasta cambios en el crecimiento y morfología; la manera en que las diversas plantas son capaces de adaptarse a su medio y tolerar el estrés es muy amplia y depende de factores como la especie, el genotipo y la etapa de desarrollo (Zhu, 2001).

En general, los mecanismos de resistencia al estrés se clasifican en dos categorías:

- **Evasión:** Tendientes a prevenir la exposición al estrés.
- **Tolerancia:** Aquellos que permiten soportar el estrés.

Algunas especies han desarrollado procesos adaptativos, los cuales les permiten tolerar un tipo específico de estrés, un ejemplo son las cactáceas que tienen mecanismos para minimizar la pérdida de agua y de esta manera, tolerar ambientes secos, mientras que otras plantas evitan el estrés alterando su crecimiento y desarrollo para prevenir que este las dañe, por ejemplo el estado de latencia de una semilla con la exposición al frío en invierno y la posterior germinación en primavera

o el crecimiento de plantas sólo en climas, altitudes o ambientes específicos (Buchanan *et al.*, 2006).

1. SALINIDAD EN LOS SUELOS

El estrés salino es una de las principales causas abióticas que afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas y representa un problema importante para la productividad agrícola (Greenway & Munns, 1980; Rhoades & Loveday, 1990). Los suelos salinos (salados) poseen un contenido alto en sales. Entre las sales presentes en altas concentraciones se incluyen carbonatos, cloruros y sulfatos de magnesio, potasio, calcio y sodio; sin embargo, el sodio y el cloro son los iones predominantes en la gran mayoría de zonas salinas (Ji *et al.*, 2013).

La salinidad en los suelos ha existido desde hace mucho tiempo y de manera natural; estas condiciones naturales de salinidad del suelo se encuentran en constante cambio debido al efecto de los factores ambientales tales como la temperatura, el nivel de precipitación, la erosión y la evaporación. Sin embargo, en los últimos años la salinidad se ha convertido en un serio problema debido a las prácticas agrícolas de carácter intensivo. La causa del problema es el uso de agua de baja calidad para la irrigación, que trae como impureza sales disueltas. La irrigación continua con este tipo de agua de pobre calidad causa que las sales se acumulen en el suelo causando modificaciones rápidas en los niveles de salinidad y en los patrones de distribución de sal en el suelo. Por ejemplo, agua para riego con una conductividad eléctrica de 0.5 dS/m que corresponde a 0.3 g/l de sal, puede llegar a depositar hasta 3,000 kg de sal por año, la cual con el paso del tiempo se acumula principalmente en la zona de las raíces (Rhoades & Loveday, 1990). Se estima que alrededor de 800 millones de hectáreas (ha) de suelo son afectadas por la salinidad, lo que representa un 6% de la superficie del mundo y alrededor del 20% de las tierras irrigadas (Munns & Tester, 2008). Estos suelos son un problema ambiental y económico, ya que generan una disminución en la producción y rendimiento agrícola y se presenta con más frecuencia en regiones con climas áridos y semiáridos; se estima que en los cultivos comerciales sólo se alcanza el

30% del rendimiento máximo debido a las condiciones de salinidad (Tabla 1; Maas & Grattan, 1999), y genera grandes pérdidas económicas principalmente en países tropicales y subtropicales (Flowers & Yeo, 1995).

Tabla 1. Porcentaje de pérdida por estrés en los principales cultivos (Buchanan *et al.*, 2006)

| Cultivo | Rendimiento Máximo (kg/ha) | Rendimiento Promedio (kg/ha) | % de pérdida por estrés |
|----------------|---------------------------------------|---|------------------------------------|
| Maíz | 19,300 | 4,600 | 66 |
| Trigo | 14,500 | 1,880 | 82 |
| Soya | 7,390 | 1,610 | 69 |
| Sorgo | 20,100 | 2,830 | 81 |
| Avena | 10,600 | 1,720 | 75 |
| Cebada | 11,400 | 2,050 | 75 |
| Papa | 94,100 | 28,300 | 54 |

La gran mayoría de las especies de plantas son sensibles a la sal (glicófitas), incluyendo muchas de las especies de cultivos de interés comercial. Sin embargo, durante la evolución, varias especies de plantas conocidas como halófitas, desarrollaron mecanismos para adaptarse a la vida en ambientes de alta salinidad y naturalmente son tolerantes a la sal (Greenway & Munns, 1980; Flowers & Colmer, 2008). La capacidad de tolerancia a la sal de la planta es controlada por muchos genes a través de redes reguladoras extremadamente complejas que deben funcionar coordinadamente para mitigar los efectos del estrés que la salinidad genera (Ji *et al.*, 2013).

2. MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD A NIVEL CELULAR

La salinidad tiene distintos efectos negativos en las plantas; rápidamente genera un estrés hiperosmótico, el cual afecta la absorción de agua, lo que reduce la expansión y crecimiento celular, también puede causar el cierre de los estomas afectando el intercambio gaseoso; posteriormente se genera un estrés iónico, el cual se da más lentamente porque el Na^+ tiene que entrar a la planta y ser transportado hacia la parte aérea, donde tiene sus efectos tóxicos, principalmente en las hojas, donde afecta la fotosíntesis, altera la disponibilidad, transporte y uso de los nutrientes, sobre todo por la competencia que tienen el Na^+ y Cl^- con iones esenciales como K^+ , Ca^{+2} y NO_3^{-1} . Además, la salinidad induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales conducen a un daño oxidativo (Jouyban, 2012).

2.1 AJUSTE OSMÓTICO

En condiciones de estrés hiperosmótico una planta no puede absorber agua, esto sólo ocurre si el potencial hídrico en la raíz es menor que el medio donde se encuentra (Blumwald *et al.*, 2000). El potencial químico de una solución salina genera un desbalance entre el potencial hídrico del apoplasto y el simplasto de la raíz, previniendo así la absorción de agua y teniendo como consecuencia una pérdida del turgor. Algunas plantas pueden tolerar esta pérdida mediante un proceso llamado ajuste osmótico. El ajuste osmótico ocurre cuando se incrementa la cantidad de sustancias disueltas en el interior de la célula (solutos compatibles), como resultado el potencial hídrico en el interior de la célula disminuye promoviendo la entrada de agua (Bohnert *et al.*, 1995). En la mayoría de las plantas que están expuestas a condiciones de estrés osmótico, se ha observado la síntesis de solutos compatibles; también llamados osmolitos, que son un grupo de compuestos químicos altamente solubles, llamados compatibles porque no interfieren con el metabolismo celular incluso en altas concentraciones. El tipo específico de sustancias acumuladas varía entre las diversas especies (Buchanan *et al.*, 2006).

Entre estos compuestos, que son de bajo peso molecular, se incluyen azúcares simples (fructosa y glucosa), polialcoholes lineales (glicerol, manitol y sorbitol), polialcoholes cíclicos (inositol, pinitol y otros derivados), aminoácidos (prolina o glutamato), azúcares complejos (trehalosa y rafinosa) y betaínas (glicina-betaína o alanina-betaína) (Jouyban, 2012; Yokoi *et al.*, 2002) (Fig. 1). Los osmolitos deben de ser compartimentalizados para realizar su función. Por ejemplo, la acumulación de estos en el citoplasma ayuda a mantener un potencial hídrico negativo mientras que en la vacuola este efecto es causado por la acumulación de iones orgánicos e inorgánicos, previniendo la salida del agua y como consecuencia manteniendo el turgor celular (Salisbury & Ross, 1992).

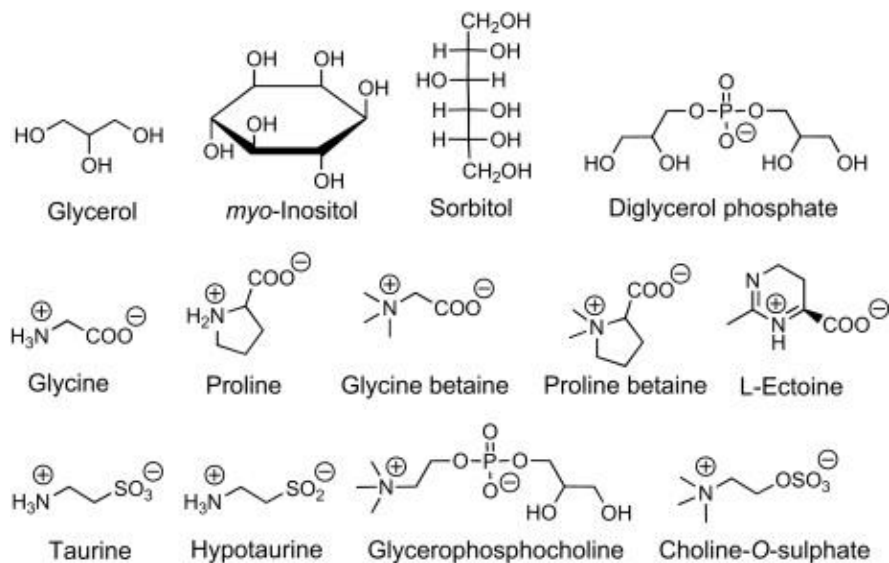


Figura 1. Estructura química de los solutos compatibles comunes (adaptado de Somero & Yancey, 1997)

Los solutos compatibles que se acumulan en la célula pueden desempeñar funciones adicionales como osmoprotectores. Se ha observado que pueden mitigar el efecto tóxico de algunos iones. La presencia del osmolito glicina previene la inactivación de la enzima RUBISCO a causa de la salinidad, mientras que el sorbitol, manitol y otros polialcoholes neutralizan las especies reactivas de oxígeno (Apel & Hirt, 2004).

2.2 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de eliminar rápidamente estos productos. Desbalances en el estado normal redox de una célula pueden llevar a la superproducción de peróxidos y radicales libres que dañan todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN (Apel & Hirt, 2004). Las especies reactivas de oxígeno incluyen iones de súper óxido (O_2^{-1}), radicales hidroxilo libres (OH^{-1}) y peróxidos (H_2O_2). Generalmente, estos compuestos o moléculas son muy pequeñas y altamente reactivas debido a la presencia de electrones de valencia no apareada (Foyer & Harbinson, 1994). En las plantas, las ROS se producen continuamente como subproductos de diversos procesos metabólicos en diferentes compartimentos celulares, principalmente en los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. La producción y eliminación de ROS deben ser estrictamente controladas con el fin de evitar daños importantes a las estructuras celulares, por lo que bajo condiciones fisiológicas normales, estas moléculas son eliminadas por diferentes sistemas antioxidantes, entre los que se encuentran las enzimas súper óxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y glutatión peroxidasa (Foyer & Noctor, 2009). El equilibrio entre la producción y la eliminación de las ROS puede ser perturbado por un sin número de factores ambientales adversos, causando que los niveles intracelulares de ROS aumenten. Esto activa una serie de sensores, los cuales son capaces de inducir cascadas de señalización que afectan la expresión génica (Apel & Hirt, 2004).

2.3 *TRANSPORTADORES IÓNICOS QUE REGULAN LOS NIVELES INTRACELULARES DE Na^+*

Es bien conocido que las plantas superiores pueden enfrentar la alta salinidad mediante dos mecanismos celulares, la exclusión o la secuestro de sal (Sykes, 1992).

Las plantas que excluyen sal poseen la habilidad de evitar su entrada a toda la planta o a ciertos órganos. En estos casos la selectividad de los transportadores de membrana favorece la absorción de K^+ sobre la de Na^+ , además estas plantas pueden desarrollar sistemas radiculares muy profundos, donde las condiciones en el suelo son menos salinas, tal es el caso de las familias de árboles *Tamarix* y *Prosopis*. Por otra parte, una adaptación presente en otras plantas, es el uso de las hojas nuevas para absorber CO_2 y realizar fotosíntesis, al mismo tiempo conteniendo y aislando el Na^+ en las hojas viejas las cuales finalmente mueren. Estas plantas requieren una constante producción de hojas jóvenes para poder crecer, estas hojas sirven para dar origen a la próxima generación de hojas, y con el tiempo, al madurar, estas hojas cambian su función fotosintética por la de acumular sal para finalmente deshacerse de ella (Hamdy *et al.*, 1996).

En algunas plantas la sal es expulsada directamente mediante glándulas especializadas de sal, esto es un método efectivo de controlar la cantidad de sal en las células. Estas glándulas están presentes principalmente en algunas especies de pastos resistentes a la sal (*Leptocloa*) y en algunas familias de dicotiledóneas (*Ipomea ssp.*). Se conoce que la estructura de estas glándulas está formada por dos células, la célula basal y la célula “cap”, la efectividad de este mecanismo depende de la capacidad de la planta de deshacerse del Na^+ y evitar su reentrada (Hamdy *et al.*, 1996). Por otra parte, las plantas acumuladoras de Na^+ , entre las que se encuentran plantas como *Atriplex ssp.* y *M. crystallinum* son capaces de enfrentar las altas concentraciones salinas acumulando el exceso de Na^+ que entra a la planta dentro de células vejiga localizadas en la epidermis de las hojas y tallos; posteriormente, al saturarse, las células vejiga se revientan y se separan de la planta con mucha facilidad, removiendo el Na^+ previamente acumulado (Barkla *et al.*, 2012; Jouyban, 2012).

2.3.1 TRANSPORTE DE Na^+ A TRAVÉS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Se sabe que en la raíz de las plantas varios canales y transportadores de nutrientes están involucrados en el transporte de Na^+ al interior de la célula desde el apoplasto

hacia el citoplasma a través de la membrana plasmática. La mayor parte de estas proteínas transportadoras de membrana, inicialmente se caracterizaron como transportadores/canales de K^+ , sin embargo, se ha demostrado que otros mecanismos también están involucrados en la absorción de Na^+ a las células; tal es el caso de los canales de cationes no selectivos (NSCC) entre los cuales se encuentran los canales regulados por nucleótidos cíclicos (cyclic nucleotide-gated channels; CNGC) y el receptor del glutamato (GLR) (Deinlein *et al.*; 2014). Además, existe evidencia que los transportadores catiónicos de baja afinidad (LCT) también podrían estar involucrados en la entrada de Na^+ a la célula (Schachtman, 2000; Blumwald *et al.*, 2000) (Fig. 2). Por otra parte, se sabe que la familia de transportadores nombrados HKT (High Affinity Potassium Transporter) está implicada en el transporte de Na^+ entre los diversos tejidos en muchas especies de plantas. Se ha demostrado que los miembros de esta familia funcionan como simportadores K^+/Na^+ o como uniportadores/canales selectivos a Na^+ en diversas especies (Garcia-deblás *et al.* 2003; Rodríguez-Navarro & Rubio, 2006; Rosas-Santiago *et al.*, 2015). En *Arabidopsis thaliana* sólo existe *AtHKT1* y se ha demostrado que la proteína que codifica corresponde a un transportador de Na^+ (Uozumi *et al.*, 2000). En contraste, en el arroz hay una gran familia de genes (9) de HKT y éstos se puede dividir en dos subfamilias; tipo HKT1 y tipo HKT2, con diferentes localizaciones y selectividades para Na^+ o K^+ (Waters *et al.*, 2013). Posteriormente, el Na^+ entra en el xilema y es transportado a los tejidos de los órganos aéreos. Se presume que este proceso se lleva a cabo por los canales de la membrana plasmática denominados canales rectificadores salientes de K^+ (KORC y NORC) (Deinlein *et al.*; 2014) (Fig. 2). La exclusión de Na^+ desde el citosol a través de la membrana plasmática también es un mecanismo importante para la mitigación de la toxicidad de este ion a nivel celular en las plantas (Blumwald *et al.*, 2000); el principal mecanismo de transporte de Na^+ hacia afuera de la célula se ha atribuido a un intercambiador de la familia NHX (*NHX7*), el cual también ha sido llamado *SOS1*, ya que está involucrado en la vía “Salt Overly Sensitive” (SOS) de *Arabidopsis thaliana* (Shi *et al.*, 2000).

En la vía de señalización SOS, el gen *SOS3* codifica para una proteína miristoilada con sitios de unión al calcio (CBL4), que parece funcionar como un sensor primario para percibir el aumento de Ca^{+2} en el citosol, provocado por el exceso de Na^{+} que ha entrado en la célula. Tras la unión con Ca^{+2} , *SOS3/CBL4* es capaz de activar e interactuar con la cinasa *SOS2/CIPK24*. Posteriormente *SOS2/CIPK24* fosforila la proteína *SOS3/CBL4* y este evento estabiliza el complejo formado por estas dos proteínas, la interacción entre *SOS3-SOS2* conduce a la activación de la proteína localizada en la membrana plasmática *SOS1/NHX7*, el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ que causa la salida del exceso Na^{+} en el citoplasma (Pandey, 2008) (Fig. 2).

La proteína *SOS1/NHX7* es una proteína localizada en la membrana plasmática de aproximadamente 127 kDa, la cual consta de 12 segmentos transmembranales putativos y una larga cola C-terminal hidrófila (aproximadamente 700 aa) (Shi *et al.*, 2000), que se ha identificado en varias plantas incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Wu *et al.*, 1996), trigo (Xu *et al.*, 2008) y *Thellungiella salsuginea* (Vera-Estrella *et al.*, 2005). El C-terminal de *AtSOS1/NHX7* contiene un dominio de activación y otro dominio de auto-inhibición que se asocian físicamente uno al otro, esta interacción suprime la actividad de *AtSOS1/NHX7* en un estado de reposo. La activación de *AtSOS1* se produce a través de la fosforilación directa del dominio de auto-inhibición por la cinasa de serina/treonina *SOS2/CIPK2* (Quintero *et al.*, 2011). Aunque las propiedades estructurales detalladas de *AtSOS1/NHX7* aún no están bien determinadas, un análisis bioquímico reciente reveló que *AtSOS1* forma un homodímero (Núñez-Ramírez *et al.*, 2012).

El papel de las proteínas de la vía SOS en la exclusión de Na^{+} y la tolerancia a la salinidad a nivel celular, está bien establecido y una cantidad cada vez mayor de evidencias también implican a las proteínas SOS en diversas funciones celulares, que igualmente son cruciales para la tolerancia a la salinidad. Se ha demostrado que *SOS2/CIPK2* interactúa con la enzima nucleósido difosfato cinasa 2 y con las catalasas 2 y 3, lo que sugiere que *SOS2/CIPK24* es parte de un punto de conexión entre la vía de señalización de la respuesta al estrés por ROS y la causada por la salinidad (Verslues *et al.*, 2007). Además, se determinó que *SOS2/CIPK24*

interacciona y modula la actividad de las proteínas situadas en el tonoplasto tales como el antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (CAX1) (Ji *et al.*, 2013), la bomba de protones vacuolar, (V-ATPasa) y el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ (NHX1), lo que indica que la proteína SOS2 juega un papel central como regulador de los mecanismos de transporte de iones hacia dentro y fuera del citoplasma bajo condiciones de estrés salino (Batelli *et al.*, 2007). También se ha demostrado que SOS2/CIPK24 y SOS3 se requieren para la inducción del gen SOS1/NHX7 en condiciones de exceso de Na^{+} y se ha mostrado que la sobre expresión de los genes de esta vía mejora la tolerancia a la salinidad de algunos cultivos sensibles a sal (Agarwal *et al.*, 2013). Además, recientemente se caracterizó, un análogo de SOS3 denominado CBL10, y ha demostrado ser un regulador alternativo de SOS2/CIPK24, mostrando actividad principalmente en los tallos de Arabidopsis, mientras que SOS3/CBL4 es más prominente en las raíces (Quan *et al.*, 2007).

2.3.2 COMPARTIMENTALIZACIÓN DEL Na^{+} EN LA VACUOLA.

Una de las estrategias que las células vegetales utilizan para la eliminación del exceso de Na^{+} en el citoplasma y así evitar su efecto toxico, es compartimentar este ion en las vacuolas centrales (las cuales pueden ocupar hasta el 90% del volumen de la célula). Los intercambiadores intracelulares $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ de la familia NHX, son las proteínas mejor caracterizadas hasta el momento que participan en este proceso (Blumwald *et al.*, 2000). La mayoría de las proteínas intracelulares NHX estudiadas hasta la fecha están involucradas en mediar el transporte de tipo intercambiador entre $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ o $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$ a través de las distintas endomembranas empleando como fuerza motora el gradiente electroquímico de H^{+} generado por las distintas bombas de protones (ATPasas y pirofosfatasas (PPasas)) (Maeshima, 2000), y se considera que son responsables del secuestro de Na^{+} en compartimentos intracelulares bajo estrés salino (Fig. 2a) (Bassil *et al.*, 2012).

La mayoría de las plantas poseen varios genes que codifican para múltiples isoformas de estos transportadores NHX. Estos se dividen en vacuolares (Clase I) o endosomales (Clase II), de acuerdo con la similitud entre secuencias y su

localización subcelular (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Bassil *et al.*, 2012). En el caso particular del tonoplasto, en *Arabidopsis* existen cuatro genes que codifican para transportadores Na^+/H^+ , NHX 1-4 (Munns, 2005). El transportador más estudiado de este tipo presente en la vacuola, es NHX1, que se propone consta de nueve segmentos transmembranales con el C-terminal hidrofílico localizado hacia el lumen vacuolar (Yamaguchi *et al.*, 2003). Sin embargo, se requiere de más evidencia que confirme esta orientación, la cual resultaría improbable, debido a que los sitios regulatorios en su C-terminal no serían accesibles al localizarse dentro de la vacuola. Este transporte es energizado por el gradiente electroquímico de H^+ generado por V-ATPasa) (Barkla *et al.*, 1995). La V-ATPasa es una enzima muy antigua y altamente conservada a nivel evolutivo entre los diversos organismos. (Cotter *et al.*, 2015) Se encuentra embebida en las membranas de un amplio número de organelos y compartimientos intracelulares como en las vacuolas, endosomas, lisosomas o vesículas secretorias y son las encargadas de acidificar el interior de estos compartimientos acoplado la energía derivada de la hidrólisis del ATP para bombear protones a través de estas membranas. Sin embargo, también hay evidencia de su presencia en la membrana plasmática de algunos tipos de células especializadas (Gluck, 1992).

La forma funcional de esta enzima consta de dos dominios (Fig. 2b), el dominio V_0 que se compone de proteínas transmembranales, responsables del transporte de protones y el dominio periférico V_1 responsable de la hidrólisis del ATP (Sze *et al.*, 1992). El dominio periférico V_1 consta por lo menos de ocho subunidades (A-H), con tres copias de las subunidades A y B, dos copias de la subunidad G, una de la subunidad E, así como una copia de las subunidades reguladoras C y H. El dominio V_1 también contiene las subunidades D y F, las cuales forman un rotor central. Se sabe que este dominio tiene isoformas específicas para cada tejido, desempeñando diversas funciones en relación a su localización (Sze *et al.*, 2002).

El dominio transmembranal V_0 consta de cinco subunidades en *Arabidopsis* (6 en levadura), a, c, c'', d y e, donde las subunidades c y c'' forman un anillo cuya composición cambia con respecto a los diferentes tejidos (Drory & Nelson, 2006).

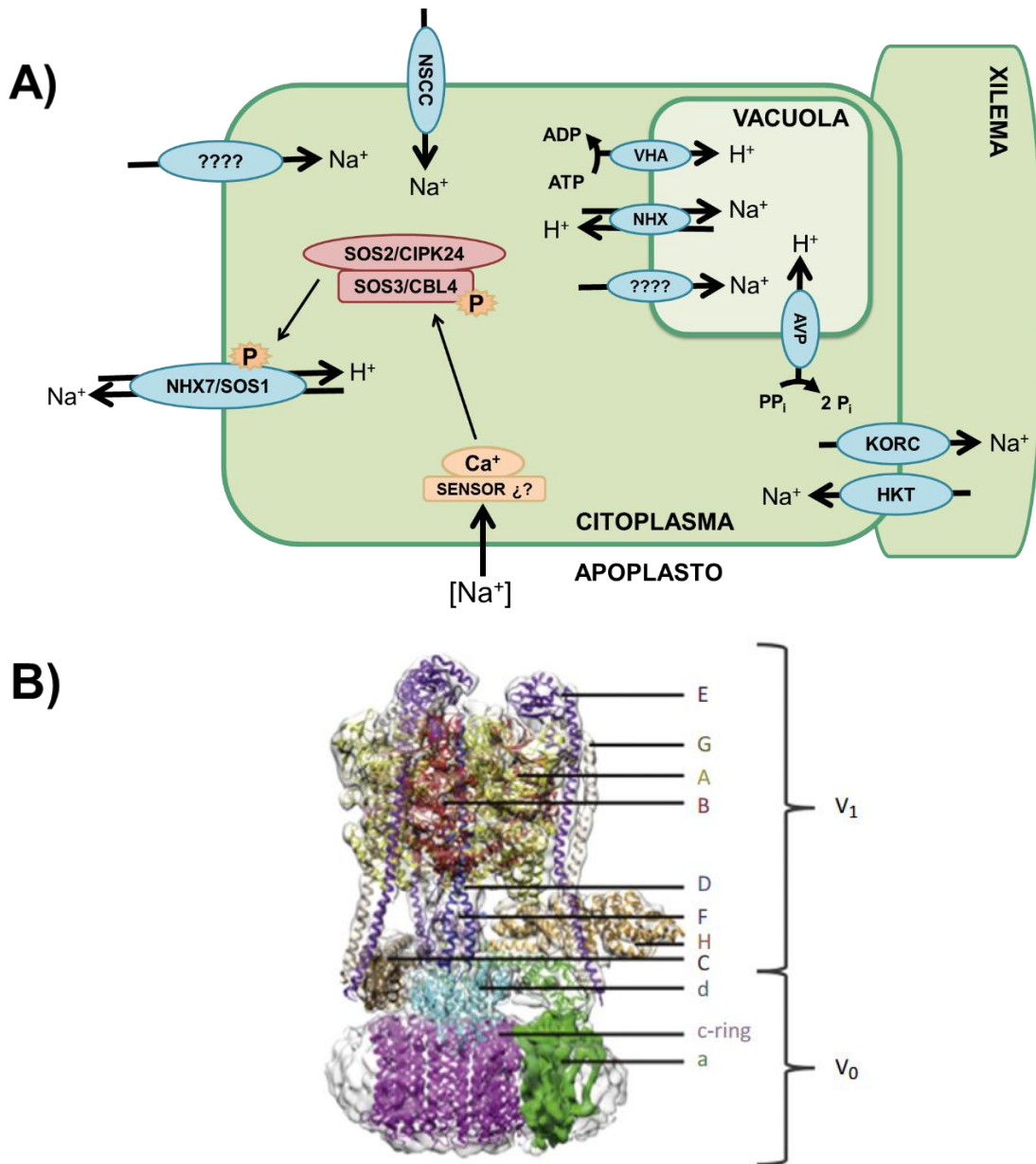


Figura 2. Principales mecanismos celulares involucrados en el transporte de Na⁺. A) Proteínas implicadas en la respuesta a la salinidad. El Na⁺ entra a la célula a través de NSCCs y otros transportadores de membrana en gran parte desconocidos. Dentro de la célula el Na⁺ es sentido por un mecanismo dependiente de Ca²⁺ aún no identificado, el cual induce la vía de señalización SOS, ésta activa a los intercambiadores Na⁺/H⁺ de la membrana plasmática y el tonoplasto, así como otros mecanismos involucrados en la detoxificación de Na⁺. Además, el Na⁺ es transportado entre los distintos tejidos a través del xilema por medio de canales HKT y KORC. **B) Modelo estructural de la V-ATPasa.** Criomicroscopía electrónica de la V-ATPasa de levadura (Cotter et al., 2015).

La rotación del rotor central es causada por la hidrólisis del ATP, la cual hace girar el hexámero A_3B_3 , causando la apertura del anillo de subunidades c y como consecuencia, la translocación de los protones a través de la membrana. Se ha propuesto una estequiometría de dos protones por cada ATP hidrolizado (Johnson, 1982). La V-ATPasa de *Arabidopsis* es la que mejor se ha caracterizado en plantas; las 13 subunidades están codificadas por 27 genes, esto genera una posibilidad de combinaciones de isoformas que generan diferentes complejos V-ATPasa con funciones y sistemas de regulación variados (Sze *et al.*, 2002). Diferencias en la actividad de la V-ATPasa entre los órganos y tejidos de la planta ante diferentes situaciones han sido reportadas (Dietz *et al.*, 2001) y están relacionadas con la presencia de isoformas de algunas subunidades de la enzima.

El potencial electroquímico de H^+ generado por estas bombas ayuda a desempeñar funciones diversas en las diferentes células y organelos; por ejemplo, este potencial energiza el transporte de Ca^{2+} (Hirschi *et al.*, 1996) y Na^+ hacia la vacuola en células vegetales (Barkla *et al.*, 1995). La actividad de la V-ATPasa aumenta bajo condiciones de salinidad (Barkla *et al.*, 2009; Hasegawa *et al.*, 2000) y numerosos estudios han mostrado que la salinidad induce cambios en el nivel de expresión de los genes codificantes para las múltiples subunidades (Ratajczak, 2000; Tsiantis *et al.*, 1996).

3. LA HALÓFITA *Mesembryanthemum crystallinum* L.

Mesembryanthemum crystallinum L. es un modelo importante en el estudio de la respuesta de las plantas al estrés salino (Cushman & Bohnert, 1992; Lüttge, 1993) (Fig. 3). *M. crystallinum* es una planta halófila, de hojas suculentas, verdes y papilosas; miembro de la familia Aizoaceae (Tabla 2), nativa de la parte sur y este de África (Winter, 1978; Bloom, 1979), pero se introdujo en el este de Australia, alrededor del mar Mediterráneo, así como en Estados Unidos, México y Chile (Gutterman, 1980; Sigg, 1981).



Figura 3. La halófila *M. crystallinum*. A) Planta tratada con sal de seis semanas de edad; B) Planta tratada con sal de 8 semanas de edad; C) Células vejiga del tallo; D) Flor con el cáliz cubierto por células vejiga.

En su hábitat natural, la planta germina y crece en condiciones de estrés salino (Adams *et al.*, 1998), que favorecieron que la especie desarrollara mecanismos

evolutivos a nivel anatómico, bioquímico y molecular para adaptarse a este ambiente, es por esto que se describe como una especie halófila ya que su crecimiento máximo se da en concentraciones moderadas de sal (200 mM) (Winter, 1978). Una característica importante de *M. crystallinum*, es que es capaz de acumular una gran concentración de sodio (hasta 1 M) en sus tejidos aéreos (Adams *et al.*, 1998).

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de *M. crystallinum*

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| Reino | <i>Plantae</i> |
| Subreino | <i>Tracheobionta</i> |
| División | <i>Magnoliophyta</i> |
| Clase | <i>Magnoliopsida</i> |
| Subclase | <i>Caryophyllidae</i> |
| Orden | <i>Caryophyllales</i> |
| Familia | <i>Aizoaceae</i> |
| Género | <i>Mesembryanthemum</i> |
| Especie | <i>M. crystallinum</i> |

Tres tipos de respuestas adaptivas se han descrito en plantas de *M. crystallinum* expuestas a la sal; la primera es un cambio del metabolismo C₃ al metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), el cual la hace capaz de utilizar el agua de manera más eficiente (Winter & von Willert, 1972); la segunda es el incremento de solutos compatibles como el pinitol y la prolina. Finalmente, la principal es que la planta comienza a secuestrar el sodio dentro de la vacuola de las células del tejido aéreo de la planta (Niu *et al.*, 1995).

La actividad del intercambiador Na⁺/H⁺ del tonoplasto se ha medido en las raíces y los diferentes tejidos aéreos de plantas adultas de *M. crystallinum*, donde se encontró que el transporte de Na⁺ era muy bajo en células de las raíces de plantas control o plantas tratadas con NaCl. En contraste, las hojas y tallos mostraron un intercambio activo Na⁺/H⁺ en la vacuola, conduciendo a la acumulación de Na⁺

dentro de la vacuola de estos tejidos, promoviendo y mejorando el crecimiento de las plantas en presencia de NaCl. La actividad más alta de cotransporte Na^+/H^+ se midió en las células vejiga de la epidermis, donde también se midió la mayor concentración de Na^+ ; conjuntamente, la actividad de la V-ATPasa fue mayor en este tejido. Lo anterior confirma la importancia de estas proteínas vacuolares en el secuestro de Na^+ y tolerancia a la salinidad en las plantas (Barkla *et al.*, 2003). Sin embargo, se conoce poco sobre el mecanismo de secuestro de sodio en la vacuola y como este es regulado en esta planta.

4. PROTEÓMICA

La proteómica es el estudio de las proteínas e incluye la exploración de todas las proteínas presentes en una célula u organismo en un momento y condiciones determinadas, abarcando todas las variantes generadas mediante *splicing* alternativo y los cambios post-traduccionales, así como las interacciones proteína y proteína. Los organismos complejos son capaces de producir cientos de miles de proteínas a partir de sólo 20 a 30 mil genes (Dhingraa *et al.*, 2005). El término proteómica se acuñó a finales de los años 90's, en similitud a la palabra "genómica" (Anderson & Anderson, 1998).

El proteoma es variable a través del desarrollo del organismo debido a los requisitos funcionales y estructurales que este requiera en diferentes tiempos y condiciones ambientales o de estrés. Así, al estudiar el proteoma en diferentes condiciones se puede tener una imagen de todas las proteínas expresadas en una condición específica, un ejemplo práctico derivado de lo anterior es que se pueden identificar proteínas cuya expresión se vea afectada bajo condiciones de interés y monitorizar su evolución (Dhingraa *et al.*, 2005).

4.1 PROTEÓMICA CUANTITATIVA

El objetivo de la proteómica cuantitativa es obtener información cuantitativa acerca de la abundancia de todas las proteínas en una muestra, comparando muestras de

diferentes condiciones, en lugar de limitarse a sólo proporcionar una lista de las proteínas identificadas (Bantscheff *et al.*, 2007).

La separación y comparación de las proteínas bajo condiciones diferentes, utilizando geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE) (Wilkins *et al.*, 1996), seguido de espectrometría de masas (MS) o MS en tándem (MS/MS) (Issaq & Veenstra, 2008), es el método clásico de identificación y cuantificación de proteínas, donde se usa la intensidad asociada a la proteína en el gel como un indicio para determinar su concentración en la muestra. Posteriormente, se desarrolló la técnica de análisis diferencial de geles de dos dimensiones (2D-DIGE) haciendo uso de marcadores fluorescentes (CyDyes). Esta es una técnica de electroforesis de dos dimensiones donde dos diferentes muestras (más un estándar interno) se pueden etiquetar con diferentes fluoróforos (Cy2, Cy3, Cy5) (Tongue *et al.*, 2001). Las muestras son mezcladas después de ser marcadas y se corren en el mismo gel para realizar la electroforesis de dos dimensiones. Al excitar y escanear el gel en las longitudes de onda correspondientes a los tres diferentes fluoróforos, usando un software especializado (Decyder, GE Lifesciences) se pueden cuantificar cambios en la intensidad de la fluorescencia y, por lo tanto, en la abundancia de la(s) proteína(s) en cada muestra. Sin embargo, existen problemas considerables al emplear la técnica de 2D-DIGE, como son el alto costo de los reactivos y equipo especializado, así como la baja solubilidad de algunos tipos de proteínas (hidrofóbicas - proteínas transmembranales) que hace imposible su inclusión en geles y su identificación (Rabilloud, 2009).

Lo anteriormente mencionado ha llevado a desarrollar técnicas de proteómica cuantitativa libres de gel, donde se hace uso de isótopos isobáricos estables. Debido a que, con excepción de su masa, las propiedades físicas y químicas de los isótopos de un elemento son las mismas, estos se han usado como marcadores en la cuantificación de proteínas directamente en el espectrómetro de masas. Técnicas como *Isotope-Coded Affinity Tag* (ICAT), *¹⁵N/¹⁴N Metabolic Labeling* (SILAC) e *Isotope Coded Protein Labeling* (ICPL) son ampliamente usadas (Zhu *et al.*, 2010). Sin embargo, estas técnicas también tienen grandes inconvenientes, incluyendo la

complejidad de los procedimientos para la preparación de las muestras, el alto costo de los reactivos, el “etiquetado” erróneo o incompleto y la necesidad de software y equipo especializado para la cuantificación de los cambios en la cantidad de proteína (Old *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2009), por estas dificultades, en los últimos años se ha incrementado el interés en desarrollar técnicas de proteómica cuantitativa libres de marcaje.

4.2 PROTEÓMICA CUANTITATIVA SIN MARCA (LABEL-FREE)

Como su nombre lo indica, en el análisis proteómico sin marca las muestras no son marcadas con isótopos o fluoróforos y son preparadas y analizadas por MS/MS de manera separada e individualmente (Fig. 4). La cuantificación de las proteínas generalmente se basa en dos criterios, el primero en la medición de los cambios de la intensidad de los iones midiendo el área debajo de cada pico de cada espectro generado (Area Under the Curve, AUC); el segundo, en el conteo de los espectros identificados para cada péptido (Spectral Count, SC). Sin importar el criterio, el análisis de los datos se hace de manera individual para cada muestra y el cambio en la abundancia de las proteínas se puede conocer comparando directamente los datos de cada una de estas (Li *et al.*, 2010).

A pesar de que existen varios métodos de análisis cuantitativo sin marcaje, el proceso de preparación de muestra y análisis por MS es el mismo para todos. Es necesaria una digestión previa de la muestra con tripsina, que es una proteasa con una alta especificidad de corte en el C-terminal de residuos de arginina o lisina, siendo muy agresiva y es estable en una amplia variedad de condiciones, además, su corte genera péptidos en el rango de masa adecuado para ser detectables por MS (Jesper & Mann, 2004). Posteriormente, se lleva a cabo la separación cromatográfica (LC) y el análisis espectrométrico (MS o MS/MS) para finalmente realizar el análisis de datos para identificar y cuantificar los péptidos. Este método tiene ventajas significativas sobre los anteriores, principalmente eliminando los inconvenientes que conlleva etiquetar las muestras (Zhu *et al.*, 2010).

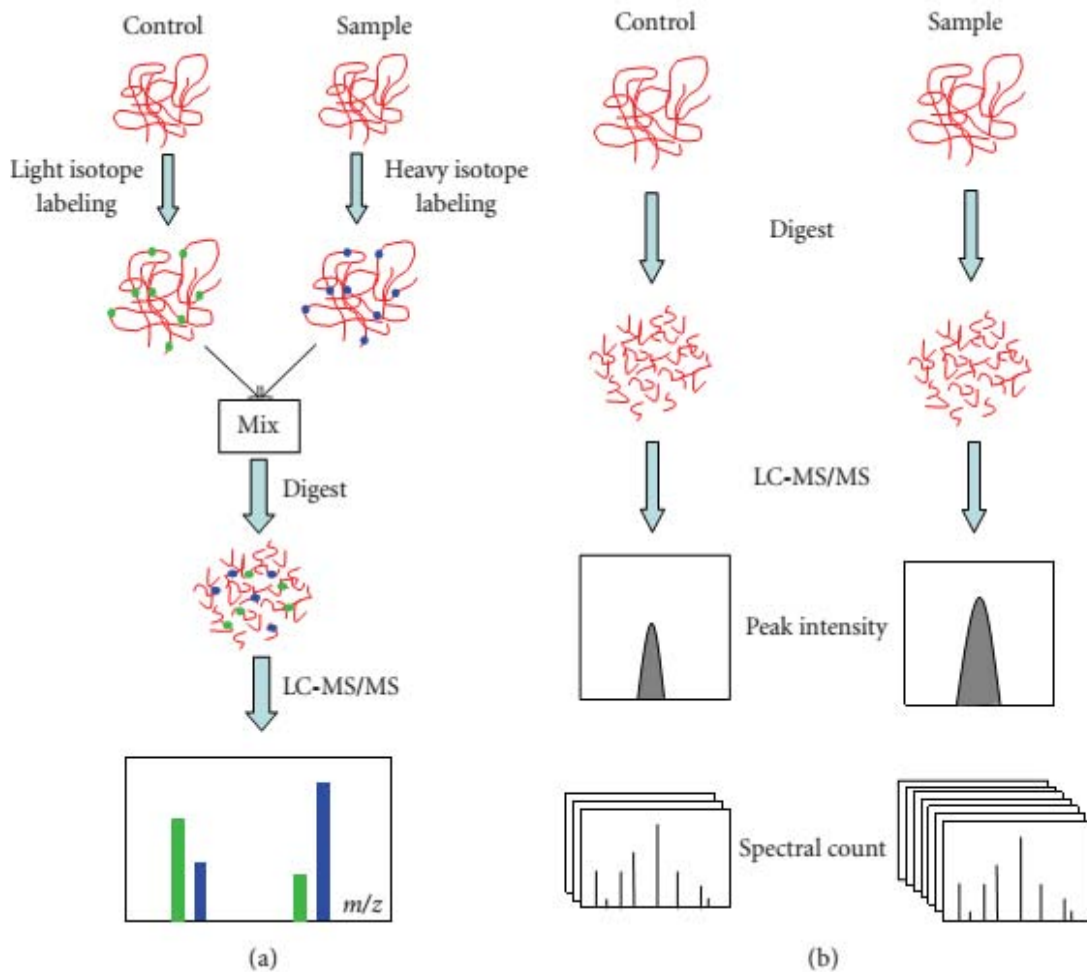


Figura 4. Diferencia entre proteómica cuantitativa con marcaje (a) y proteómica cuantitativa sin marcaje (b) (Zhu *et al.*, 2010).

4.2.1 CUANTIFICACIÓN POR CONTEO DE ESPECTROS

En este caso, la cuantificación de proteína se realiza contando el número de espectros registrados durante el análisis MS/MS de cada péptido, con los cuales posteriormente se identifica cada proteína. Esto es posible debido a que la abundancia de una proteína generalmente correlaciona con el número de espectros de sus péptidos identificados y esta relación es lineal a lo largo de un gran rango dinámico (Zhu *et al.*, 2010). En consecuencia, es posible comparar dos conjuntos de datos y calcular la diferencia en abundancia relativa de las proteínas presentes, en contraste con otro tipo de análisis proteómico, no es necesario el uso de algoritmos computacionales complejos para analizar y comparar los datos (Old *et al.*, 2005). Su fácil uso, implementación y resultados efectivos, han hecho que el conteo de

espectros para la cuantificación de proteínas se haya incrementado en el estudio de muestras biológicas complejas (Rappsilber, 2002; Pang, 2002).

4.3 BIBLIOTECA COMBINACIONAL DE LIGANDOS HEXAPEPTÍDICOS (COMBINATORIAL HEXAPEPTIDE LIGAND LIBRARY/CPLL)

Aunque los métodos de análisis proteómico, especialmente la espectrometría de masas (MS), están mejorando constantemente, éstos sólo permiten ver un pequeño subconjunto del proteoma total. Un gran problema asociado a los análisis proteómicos, es que las diferentes especies de proteínas dentro de una muestra compleja, se encuentran en abundancias diferentes, es decir, tienen distintas concentraciones, las cuales pueden diferir hasta en varias órdenes de magnitud (Corthals *et al.*, 2000). Por lo tanto, la mayoría de las muestras biológicas contienen sólo unas pocas proteínas dominantes, que se encuentran en alta abundancia, y un gran número de proteínas de baja abundancia, que a menudo no se detectan durante el análisis. Se estima que más del 50% de todas las proteínas en cualquier proteoma son especies poco abundantes que caen por debajo del límite de detección de las tecnologías actuales (Boschetti & Righetti, 2008a). Para superar este problema, se han desarrollado técnicas de fraccionamiento de las muestras antes de realizar el análisis por MS, lo cual reduce la complejidad de la mezcla de proteínas en la muestra de manera significativa. Estos tipos de herramientas comprenden no sólo todos los posibles métodos cromatográficos y electroforéticos (especialmente los que están basados en el punto isoeléctrico), sino también la fraccionación de organelos y la eliminación de las especies más abundantes mediante la captura selectiva a través de anticuerpos. Aún con el uso de estas técnicas, el gran número de distintas proteínas que existen dentro de un proteoma y su amplio rango de concentraciones, complica su análisis a través de electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones (2D-DIGE) o espectrometría de masas (MS).

Recientemente se desarrolló una nueva técnica para ayudar a capturar el "proteoma oculto", es decir, las proteínas de muy baja abundancia que constituyen más de la

mitad de las especies en cualquier proteoma, usando una biblioteca combinacional de hexapéptidos (Combinatorial Hexapeptide Ligand Library - CPLL), (Boschetti & Righetti, 2008b; Fröhlich *et al.*, 2012). La CPLL se basa en el principio de adsorción de afinidad en fase sólida, de manera similar a una columna de cromatografía de alta afinidad, que permite la captura selectiva de una proteína dada y, por lo tanto, su enriquecimiento. Para la construcción de la biblioteca se hace uso de los 20 aminoácidos presentes de manera natural en las proteínas, los cuales, al combinarse en hexapéptidos, teóricamente darán como resultado 64 millones de ligandos diferentes (20^6). Un solo tipo de ligando es adherido de manera repetitiva a la superficie de una esfera que forma parte de una matriz sólida, de manera que cada ligando puede llegar a alcanzar una concentración de aproximadamente 10 a 15 pM de proteína por esfera, la capacidad de unión total de proteína para cada esfera es de alrededor de 1-3 ng, dependiendo de la masa molecular de la proteína capturada, asegurando una captura máxima que varía de 5 a 10 mg de proteína por ml de esferas (Boschetti & Righetti, 2008a). La unión específica de cada proteína a la CPLL, depende de las propiedades fisicoquímicas de la proteína, tales como la conformación, hidrofobicidad y punto isoeléctrico, pero la interacción entre las proteínas y sus ligandos parece ser mediada principalmente por fuerzas hidrófobas en conjunto con otras fuerzas débiles como lo son los puentes de hidrogeno, interacción ion-ion y dipolo-dipolo. Dado que sólo existe una concentración determinada de cada ligando, las concentraciones relativas de cada especie de proteína atrapada se definen en base a la afinidad por su ligando y el grado de saturación de cada uno de estos, además de la concentración inicial de cada especie de proteína (Righetti & Boschetti, 2008b; Keidel *et al.*, 2010).

Al incubar la muestra con la biblioteca CPLL, las proteínas de alta abundancia saturan su ligando rápidamente, por lo que sólo una parte del total de esta proteína queda unida a la matriz, mientras que las especies de baja abundancia son atrapadas completamente por su ligando. Las proteínas abundantes no unidas se eliminan de la matriz por lavado, mientras que las proteínas unidas son eludidas posteriormente de la matriz. La mezcla de proteína resultante debe contener todas

las proteínas presentes en la muestra original, aunque con un rango dinámico de concentraciones más estrecho (Fig. 5).

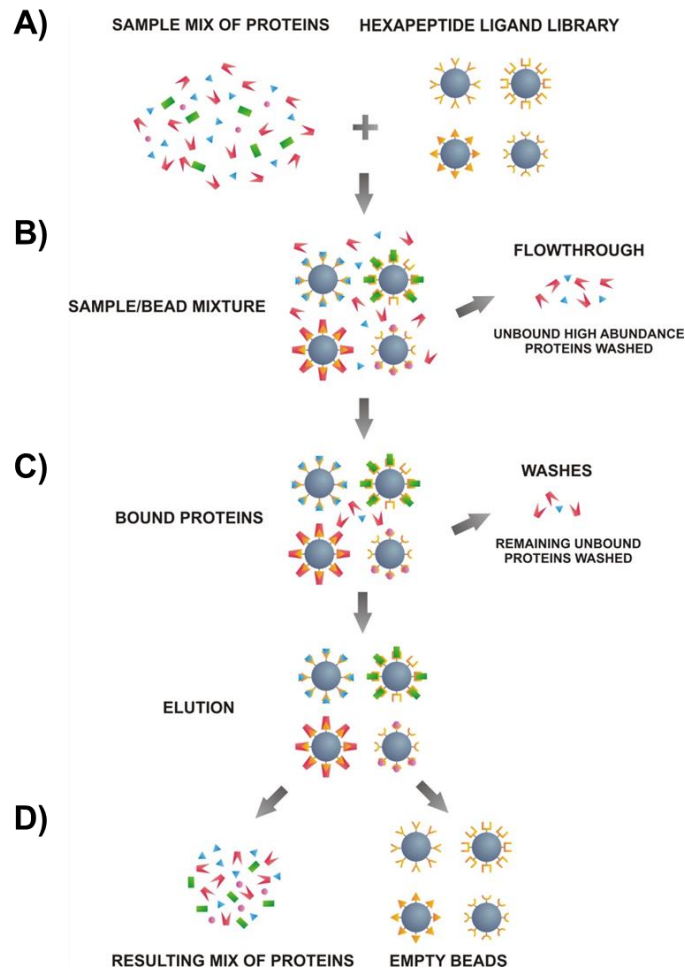


Figura 5. Principio de la técnica de CPLL. **A)** Cada esfera lleva adherido en toda su superficie millones de copias de un ligando hexapeptídico único, diferente de cualquier otra esfera. **B)** Las proteínas de alta abundancia saturarán rápidamente sus correspondientes ligandos, mientras que las proteínas de baja abundancia serán capturadas por completo. **C)** Las proteínas sobrantes no unidas se lavan, mientras que las proteínas unidas se eluyen. **D)** La nueva mezcla posee un rango dinámico de concentraciones más pequeño.

ANTECEDENTES

Anteriormente se ha descrito la importancia de los mecanismos de transporte iónico que están involucrados en la tolerancia a la salinidad en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y algunos cultivos de interés comercial como la cebada, el trigo y el arroz (Qui *et al.*, 2003 Huang *et al.*, 2008; Vera-Estrella *et al.*, 2014). También,

se ha utilizado la halófito *M. crystallinum* como modelo para estudiar los mecanismos involucrados en el transporte y distribución de Na⁺. Para esto, se han realizado análisis proteómicos del tonoplasto de *M. crystallinum* enriquecido por medio de Electroforesis Zonal de Flujo Libre (FFZE), junto con la electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones (2D-DIGE) (Barkla *et al.*, 2007; Barkla *et al.*, 2009), con el objetivo de identificar proteínas del tonoplasto que responden a la salinidad. En estos estudios se encontró que la cantidad de las enzimas glicolíticas, aldolasa y enolasa, aumentó en condiciones de salinidad. Además, se observó que estas dos enzimas glicolíticas interaccionaron directamente con la V-ATPasa. Ensayos de cinética enzimática mostraron que la aldolasa estimuló la actividad de la V-ATPasa mediante el aumento de su afinidad por el ATP. El estudio reveló datos importantes sobre el papel de la V-ATPasa en la tolerancia a la salinidad y sus posibles mecanismos de regulación. A pesar de los resultados revelados por este estudio, existen problemas considerables al emplear la técnica de 2D-DIGE en el estudio de proteínas de membrana, debido a que las proteínas hidrofóbicas tienen pobre solubilidad en los geles (Rabilloud, 2009).

Para superar esta limitación, en el presente estudio se ha considerado otro enfoque para realizar el análisis e identificar proteínas del tonoplasto que respondan a la salinidad, donde se emplean técnicas de proteómica no sólo libres de gel, sino que también libres de marcaje, ya que resultados recientes han demostrado que este tipo de técnicas permiten la identificación de proteínas con un rango más amplio, ya que también se contabilizan las proteínas hidrofóbicas (Rabilloud, 2009).

HIPÓTESIS

En *M. crystallinum* existen proteínas asociadas al tonoplasto que están involucradas en la acumulación de Na⁺ dentro de la vacuola de las células de las hojas confiriéndole tolerancia a la salinidad.

OBJETIVOS

General

Identificar proteínas involucradas en la acumulación de Na⁺ en la vacuola o que participen en la regulación de este proceso.

Particulares

- Aislar la fracción microsomal de hojas de *M. crystallinum*.
- Aislar la fracción membranal correspondientes al tonoplasto mediante Electroforesis Zonal de Flujo Libre (FFZE).
- Enriquecer la fracción de proteínas poco abundantes empleando una biblioteca combinatoria de ligandos hexapéptidos (CPLL).
- Identificar las proteínas del tonoplasto por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS).
- Anotar y describir las proteínas identificadas.
- Identificar las proteínas que muestren una diferencia en su abundancia en plantas tratadas con NaCl, por medio del método de cuantificación de Espectros Totales (Total Spectra/TS).
- Validar el cambio en abundancia de algunas de las proteínas identificadas por inmunodetecciones tipo Western Blot.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Las plantas de *M. crystallinum* se obtuvieron a partir de semillas que se germinaron en charolas de plástico con sustrato Metro Mix 510 (SUN GRO Horticulture, WA, EUA) mezclado con agrolita (DicaMex, México) en una proporción de 4:1, en un invernadero en condiciones de iluminación y fotoperiodo naturales correspondientes a una altura de 1800 msnm, manteniendo la temperatura entre 20 °C y 25 °C. A las tres semanas después de la germinación, las plántulas se trasplantaron a macetas de 16 cm de diámetro con el mismo sustrato, colocándo dos plantas por maceta. Las plantas se regaron cada dos días con agua corriente y una vez a la semana con solución nutritiva de Hoagland al 50% (Hoagland, 1950), que consiste en $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5 mM, KNO_3 3 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mM, H_3BO_3 23 μM , MnSO_4 8.1 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.39 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.16 μM y $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 μM . El tratamiento con NaCl a una concentración de 200 mM comenzó a aplicarse a la sexta semana después de la siembra, cada dos días por un periodo de 14 días. Las plantas se cosecharon a las ocho semanas de edad.

MEDICIÓN DE LA OSMOLARIDAD

Para medir la osmolaridad de los tejidos, se colectó 1 g de hojas y tallos de plantas de *M. crystallinum* de ocho semanas de edad, tratadas con sal (200 mM) por dos semanas, usando como control un grupo de plantas sin tratar. Para extraer la savia celular, los tejidos se colocaron dentro de una jeringa de 5 ml conteniendo un filtro de papel en el fondo y se congelaron a -30°C para romper las células; posteriormente los tejidos se descongelaron y la savia celular se colectó por centrifugación a 13 000 xg por 5 min. La osmolaridad de la savia se determinó en 50 μl de muestra con la ayuda de un osmómetro crioscópico (Osmomat 030, Gonotec, EUA).

AISLAMIENTO DE MICROSOMAS

Para el aislamiento de la fracción microsomal (todas las membranas celulares) se colectaron 30 g de material vegetal tomados del segundo y tercer par de hojas de la planta; la vena principal de la hoja se removió y el tejido se homogenizó en 300 ml de medio de homogenización compuesto de manitol 400 mM, glicerol 10% (p/v), Tris 30 mM, EGTA 5 mM, BSA (albúmina sérica bovina) 0.5% (p/v), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) 0.5 mM, dibucaina 0.25 mM, MgSO₄ 5 mM, DTT (dithiothreitol) 2 mM, benzamidina 1 mM, metabisulfito de potasio 26 mM y PVP-10 5% (p/v), ajustado a pH 8.0 con H₂SO₄, enfriado a 4°C, empleando una licuadora de laboratorio (modelo 51BL30, Waring, Torrington, CT, EUA). Todo el procedimiento se llevó a cabo a una temperatura de 4°C, asegurándose que todo el material empleado previamente a su uso estuviese enfriado. El material vegetal homogenizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 10,000 xg por 20 min usando una centrifuga de alta velocidad (X-30I, Beckman Instruments, CA, EUA). La pastilla conteniendo restos celulares se desecharon y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 100,000 xg por 50 min usando un rotor de ángulo fijo (Ti 45.5, Beckman Instruments) en una ultracentrífuga (L8-M, Beckman Instruments). El sobrenadante se desechó y la pastilla de microsomas se resuspendió en 1 ml de medio de suspensión compuesto por manitol 400 mM, glicerol 10% (p/v), Tris/Mes 10 mM pH 8.0 y DTT 2 mM, utilizando un homogeneizador de vidrio tipo Potter Elvehjem de 10 ml. Una vez resuspendidos, los microsomas se repartieron en alícuotas de 1.5 ml para después ser congelados con N₂ líquido y conservados a -80°C para su uso posterior (Barkla *et al.*, 1995).

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Antes de realizar la cuantificación del contenido de proteína, las fracciones microsomales de hojas de *M. crystallinum* se centrifugaron a 13 000 xg por 5 min, con el fin de precipitar las impurezas y restos celulares no homogenizados. La cantidad de proteína en las membranas microsomales se determinó usando el método colorimétrico de Bradford modificado (1976), para ello las proteínas

contenidas en las membranas aisladas se solubilizaron con Tritón X-100 0.05% (v/v) por 5 min antes de realizar el ensayo. Las muestras de proteína solubilizadas se diluyeron con un volumen de 800 µl de H₂O milliQ y se les adicionó 200 µl de reactivo de Bradford (BioRad, México). Las muestras se colocaron en celdas de plástico de 1 cm y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Diode Array, Hewlett-Packard, México). Las mediciones obtenidas se compararon con una curva estándar realizada con diluciones seriadas de albumina sérica bovina (a partir de 1mg/ml) para determinar la concentración de proteínas en las muestras.

SEPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Para la separación de las proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se precipitaron 200 µg de proteína mediante la dilución (50:1) en una solución de etanol/acetona (1:1) que se almacenó inmediatamente a -30°C durante toda la noche. Las proteínas precipitadas se colectaron centrifugando a 13,000 *g* por 20 min; el sobrenadante se eliminó, mientras la pastilla se secó con aire y se resuspendió en 75 µl de solución amortiguadora de Laemmli 1x con SDS 2.5%. 10 µg de proteína se calentaron a 60°C por 2 min antes de cargarlos en un gel de poliacrilamida al 10% sometido a electroforesis en solución amortiguadora de corrida (Tris/HCl 25 mM pH 8.3, glicina 250 mM, SDS 0.1%) aplicando un voltaje de 200 V por 60 min. El gel de poliacrilamida se procesó para Western Blot o se tiñó con azul de Coomassie (2.5 g/L en metanol 40% y ácido acético 7%) por 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. El gel teñido se trató con solución de metanol 40% y ácido acético 7% durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, se realizó un registro fotográfico del gel empleando un fotodocumentador (Gel Doc XR+ BioRad, EUA).

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNODETECCIÓN

Para los ensayos tipo Western Blot las proteínas en los geles SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando una solución amortiguadora de transferencia (Tris base 48mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v)) y aplicando un voltaje de 100 V por 75 min. La transferencia de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa se verificó tiñéndolas con colorante rojo Ponceau S (0.1% en ácido acético glacial 1%) por 30 s. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con solución de leche libre de grasas (Svelty, Nestle, México) al 5% en TBS (Tris/HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) con azida de sodio (NaN_3) 0.02% por 2 h a temperatura ambiente. Para la inmunodetección de proteínas microsomales, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios, anti-RUBISCO, anti-VHA-E, anti-VHA-A, anti-VHA-B, anti-PEPC (Agrisera, Suecia), anti-VPS29 y anti-VPS35 (amablemente donados por del Dr. Ikuko Hara-Nishimura del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Kyoto), empleando una dilución 1:1000 para todos ellos. Las membranas expuestas a los anticuerpos primarios se lavaron tres veces consecutivas por 10 min con TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.6), TBS-T (Tween 20 0.1% en TBS) y de nuevo con TBS. Las membranas se incubaron con una dilución 1:5000 de anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa por 3 h a temperatura ambiente, para volver a ser lavadas nuevamente de la manera descrita. La inmunodetección de las proteínas correspondientes se llevó a cabo por medición de señal de quimioluminiscencia usando el sistema ECL Luminata - Crescendo (Millipore, EUA), y revelando con un escáner con detector de quimioluminiscencia C-Digit y el software Image Studio (Li-Cor, EUA). La cuantificación relativa de proteínas se realizó empleando el software de libre acceso Image-J (<http://imagej.nih.gov/ij>).

TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON PLATA

La tinción de proteínas con plata se realizó con el sistema Dodeca Silver Stain (BioRad, EUA), siguiendo el protocolo original del fabricante, el registro fotográfico de los geles teñidos se realizó empleando un fotodocumentador (Gel Doc XR+, BioRad, EUA).

ELECTROFORESIS ZONAL DE FLUJO LIBRE (FFZE)

Los microsomas aislados de hojas de *M. crystallinum* se fraccionaron por medio de electroforesis zonal de flujo libre (FFZE) empleando el sistema BD FFE (BD Proteomics, Alemania). Previo a la separación, las membranas microsomales se diluyeron (1:1) [v/ v] en medio de separación (TEA (trietanolamina) 10 mM, ácido acético 10 mM, KCl 2 mM y sacarosa 250 mM) y centrifugadas a 14 000 xg por 20 min a 4°C. Para favorecer el enriquecimiento del tonoplasto, al sobrenadante se le agregó MgSO₄ 3 mM y Tris/ATP 3 mM pH 6.5 (Barkla et al, 2007). Las muestras se inyectaron de manera continua a la cámara de separación del equipo a través de la entrada de alimentación situada en el ánodo por medio de una bomba peristáltica con una velocidad de flujo de 1.2 ml/h.

La cámara de separación del sistema FFZE se alimentó continuamente con medio de estabilización (TEA (trietanolamina) 40 mM, ácido acético 40 mM, KCl 8 mM y sacarosa 180 mM), a través de las entradas uno a siete. Las soluciones electrolíticas catódicas y anódica estaban compuestas por TEA 100 mM, ácido acético 100 mM y KCl 20 mM ajustadas a pH 7.4 con NaOH; a la solución anódica se le agregó formaldehído 4%, para evitar la pérdida de cloruro por oxidación anódica. Como contraflujo en las entradas C1, C2 y C3, también se utilizó medio de separación. La FFZE se llevó a cabo de manera horizontal con un voltaje constante de 750 V, una corriente de 135 mA y una velocidad de flujo y contraflujo de los medios en la cámara de separación de 250 ml/h, la temperatura de la cámara se mantuvo a 4°C durante todo el experimento a través de un flujo continuo de agua refrigerada.

La separación de las membranas microsomales por FFZE se monitorizó durante todo el proceso mediante la colección de muestras de cada una de las fracciones en placas de 96 pozos (250 µl/pozo), al inicio y final de la corrida y la medición de la concentración de proteína (a una longitud de onda de 280 nm) por medio de un lector de microplacas (Power Wave, Bio-Tek Instruments, EUA). Las fracciones 12 a 22 del proceso FFZE, se colectaron todas juntas en tubos de vidrio de 80 ml. Las fracciones provenientes de tres diferentes replicas biológicas, tanto para el grupo control como para el tratado con NaCl, se concentraron individualmente por centrifugación en un rotor Beckman Ti 55.2 en una ultracentrifuga L8-M a 100 000 xg durante 50 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y la pastilla resuspendida en 2 ml de medio de homogenización que contiene manitol 250 mM, glicerol al 10% (p/v), Tris/MES 10 mM pH 8.0 y DTT 2 mM, las muestras se congelaron con N₂ líquido y almacenados a -80°C.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE BAJA ABUNDANCIA

Para disminuir la concentración de proteínas abundantes se empleó el sistema ProteoMiner (Bio-Rad, México), siguiendo la metodología planteada en el manual del fabricante con algunas modificaciones. Para el tratamiento de membranas microsomales crudas, se optó por añadir 200 mg de proteína a las columnas para equilibrarlas con un volumen de 1 ml de buffer proporcionado por el fabricante, la incubación se realizó a temperatura ambiente durante 3 h con agitación constante. Las esferas CPLL se lavaron cuatro veces y las proteínas se eluyeron de la columna empleando el buffer de elución propuesto por Frölich *et al*, 2012 (SDS 4%, DTT 50 mM, 95°C). Para el tratamiento de las fracciones puras de tonoplasto, se añadieron 350 µg de proteína a la columna, siguiendo el resto del protocolo anterior.

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON ACIDO TRICLOROACÉTICO

Previo al envío de las muestras para realizar el análisis de espectrometría de masas LC-MS/MS, todas las muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 72% a 4°C por 3 h. Posteriormente se centrifugaron a 10,000 xg por 20 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en acetona al 90% e incubada

por 16 h a -30°C . La proteína precipitada se recuperó por centrifugación a 10,000 xg por 20 min, se evaporó la acetona en su totalidad y se conservó la pastilla.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS LC-MS/MS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ANÁLISIS DE BASE DE DATOS

El análisis cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) se realizó en la Unidad de Proteómica del Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Canadá. Las mezclas de péptidos se analizaron mediante nano LC-MS/MS utilizando un muestreador automático Finnigan MicroAS y un sistema de bomba MS Surveyor acoplado a un LTQ-Orbitrap (Thermo, San José, CA). 40 μl de cada mezcla se cargaron en una precolumna C18 (Symmetry 300 C18 5 μm , nano-Esi Trap Column, Waters, Boston, MA) con un flujo de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ por 15 min en 0.1% de ácido fórmico en 5% CH_3CN . Los péptidos se eluyeron usando un gradiente del 5-35% de disolvente B (Ácido fórmico al 0,1% en 100% de CH_3CN) durante 60 min a un flujo de 300 nl/min con una columna C18 BioBasic PicoFrit (PFC7515/BI/10, New Objective, MA.). La adquisición de datos se llevó a cabo con el software Xcalibur. El análisis de transformada de Fourier (FT) se adquirió por medio de la Orbitrap desde 300 a 1,800 m/z , con poder de resolución fijado en 30,000 (400 m/z). Los cinco picos más intensos se aislaron secuencialmente en una trampa de iones lineal (LTQ) utilizando disociación colisional inducida. Para el escaneo MS el rango de la relación m/z se estableció de 380 a 2,000 con un valor objetivo de 1,000,000 de cargas y para el escaneo MS/MS se estableció en $\sim 1/3$ de la relación m/z original hasta 2,000 con un valor objetivo de 10,000 cargas. El escaneo de datos se llevó a cabo utilizando un tiempo máximo de llenado de iones de 100 ms y 1 microscan. Para evitar la duplicación de datos de MS/MS para el mismo péptido, la exclusión dinámica se estableció en 2 y los iones seleccionados se colocaron en la lista de exclusión por 45 s. Los datos en bruto de los espectros del MS/MS se convirtieron en archivos DTA utilizando Thermo Electron Bioworks 3.2 y se analizaron por medio de TurboSEQUENT (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Los voltajes del nanospary y S-lents se fijaron a 0.9-1.8 kV y 50 V, respectivamente, la temperatura

del capilar se fijó a 225°C. Las condiciones MS/MS fueron: energía de colisión normalizada, 35 V; activación Q, 0.25; tiempo de activación, 10 ms.

Los espectros de masas en tándem de todas las muestras de MS/MS se analizaron mediante el uso del programa Mascot Daemon versión 2.3.02. (Matrix Science, Londres, UK) y X! Tandem (The GPM, thegpm.org; versión 2007.01.01.1). Mascot se programó para buscar en la base de datos de nr_20101214 (Viridiplantae, 2010 12 14, 848702 entradas) asumiendo la digestión con tripsina. X! Tandem fue programado para buscar un subconjunto de la base de datos nr_20101214, también asumiendo digestión con tripsina. Mascot y X! Tandem hicieron búsquedas con una tolerancia del fragmento ion/masa de 0.60 Da y una tolerancia iónica de 12 ppm. La oxidación de la metionina y el derivado de yodoacetamida de cisteína se especificó en Mascot y X! Tandem como modificaciones variables. Se utilizó el software Scaffold (Scaffold 4.0.5, Proteome Software Inc., OR, EUA) para validar la identificación MS/MS de los péptidos y proteínas. La identificación de los péptidos fue aceptada sólo si se pudo determinar con más de un 95% de probabilidad por medio del algoritmo Peptide Prophet (Keller *et al.*, 2002). La identificación de Mascot requirió que las puntuaciones de iones fuesen mayores que las puntuaciones de identidad asociadas de 20, 15 y 15 para péptidos con carga doble, triple y cuádruple, respectivamente. La identificación X! Tándem requirió que al menos el valor de -log (Expect) fuera mayor que 25. Las identificaciones de proteínas se aceptaron si se detectaron con más del 99% de probabilidad y con al menos dos péptidos únicos (Barkla *et al.*, 2012).

ANOTACIÓN DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

La anotación de las proteínas se realizó mediante el software BLAST2GO (Ver. 2.8) (Conesa & Götz, 2008), el cual realiza comparaciones de secuencias de proteínas basadas en su homología utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Para realizar los alineamientos, se empleó como referencia la base de datos Uniprot/SwissProt, que al día 01/02/15, contiene información sobre 460 670, proteínas; la base de datos ha sido manualmente revisada y curada y muestra

evidencia sobre la existencia de la proteína extraída directamente de la literatura, esta evidencia es clasificada en varios niveles que le dan un puntaje desde una hasta cinco estrellas a cada proteína. La información obtenida en la anotación realizada por BLAST2GO para todo el conjunto de proteínas, se revisó y verificó de manera manual.

CONTEO DE ESPECTROS

El conteo de espectros se llevó a cabo mediante el software Scaffold (Ver. 4.0) (<http://www.proteomesoftware.com/products/scaffold/>). La cuantificación en el cambio de la abundancia de realizó empleando el método de Espectros Totales (TS) (Barkla *et al.*, 2012), el cual cuenta el número de espectros de cada proteína para cada condición y los compara directamente. Se tomaron en cuenta las proteínas cuya expresión disminuyera por lo menos a la mitad, o por el contrario, que aumentara por lo menos al doble. Las proteínas seleccionadas debieron contener dos péptidos únicos en por lo menos dos replicas biológicas diferentes, además el nivel de confiabilidad de la cuantificación fue mayor del 95% ($t < 0.05$). Para el análisis GO de enriquecimiento, se tomó el total de espectros contados para todas las proteínas identificadas en cada una de las muestras y se comparó el total de espectros entre cada condición, se consideró de interés tanto una disminución como un aumento de por lo menos 30% en alguna categoría.

RESULTADOS

CRECIMIENTO DE *M. crystallinum* Y MEDICIÓN DE LA OSMOLARIDAD DE LA SAVIA CELULAR.

M. crystallinum es una planta halófila, por lo que su desarrollo se ve estimulado cuando crece en concentraciones de alrededor de 200 mM de NaCl (Fig. 6A). Uno de los mecanismos que esta planta posee para tolerar condiciones de alta salinidad, es la presencia, tanto en los tallos como en las hojas, de tricomas especializados llamados “células vejiga”, que tienen una gran vacuola donde la planta dirige y almacena el sodio, evitando su efecto tóxico en el resto de los tejidos (Fig. 6B y C).

A medida que las células de las hojas comienzan a acumular y secuestrar Na⁺ en la vacuola, necesitan realizar un ajuste osmótico para mantener la homeostasis en el transporte de agua y nutrientes. Para lograr esto, la planta inicia la síntesis de algunos solutos compatibles como el pinitol y la prolina, los cuales ayudan a equilibrar el potencial osmótico dentro de la célula, así el flujo y distribución de los diferentes nutrientes no se ve afectado; ambos procesos conducen al incremento de la cantidad de sustancias disueltas en la planta, por lo que se espera que el valor de la osmolaridad se vea incrementado en las plantas tratadas con sal en comparación al de las no tratadas. Para confirmar lo planteado, como indicador del estrés salino se realizó la medición de la osmolaridad del tejido aéreo (hojas y tallos) en plantas de *M. crystallinum* en condiciones control y tratadas con 200 mM de NaCl por dos semanas, en las que la turgencia de las células vejiga es evidente (Fig. 7A).

Los datos generados, mostraron un incremento de la osmolaridad tanto en tallos ($\uparrow 0.4 \text{ Osm kg}^{-1}$) como en hojas ($\uparrow 0.3 \text{ Osm kg}^{-1}$) de plantas tratadas con 200 mM NaCl con respecto a la de plantas control (Fig. 7B). Esto resulta significativo ya que representa un incremento de aproximadamente el doble del valor de las plantas control. También se registró una diferencia de 0.15 Osm kg^{-1} en el valor de la

osmolaridad entre tallos y hojas de plantas tratadas (Fig. 7B), lo que sugiere una mayor capacidad de almacenaje de sodio en el tallo que en las hojas.

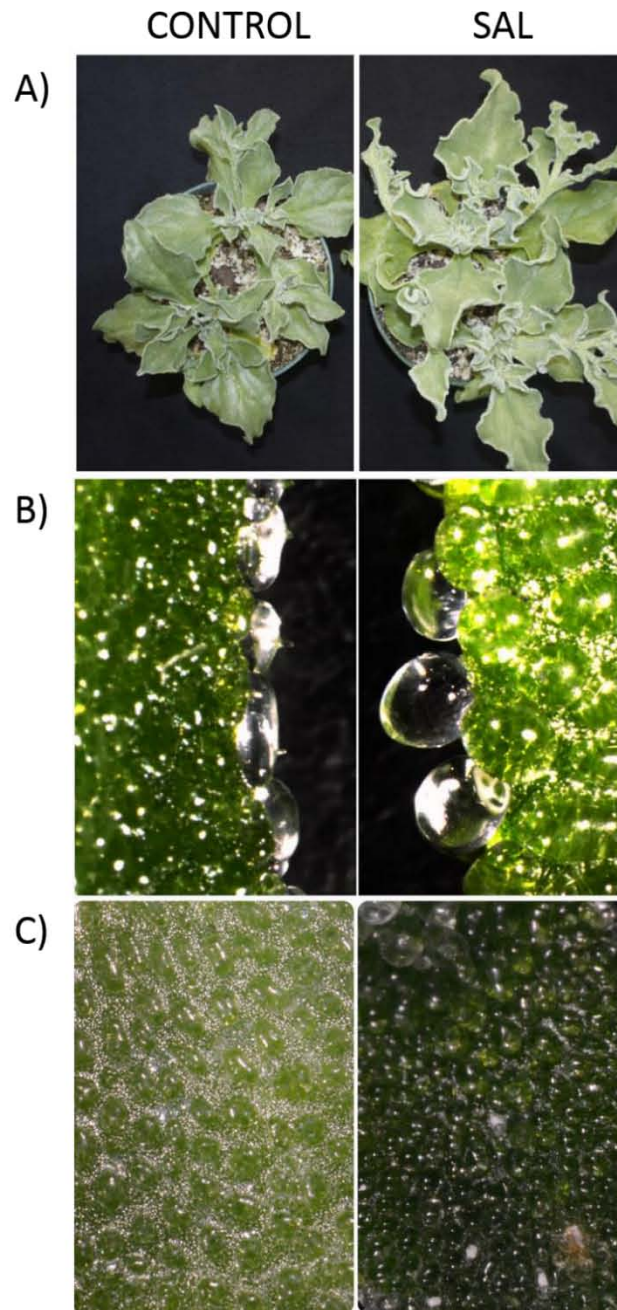


Figura 6. Morfología de Plantas de *M. crystallinum* cultivadas en invernadero. A) Plantas de ocho semanas de edad; **B)** Células vejiga en el tallo de plantas de 8 semanas de edad; **C)** Células vejiga en las hojas de plantas de 8 semanas de edad; **CONTROL;** plantas sin tratar, **SAL;** plantas tratadas con 200 mM NaCl.

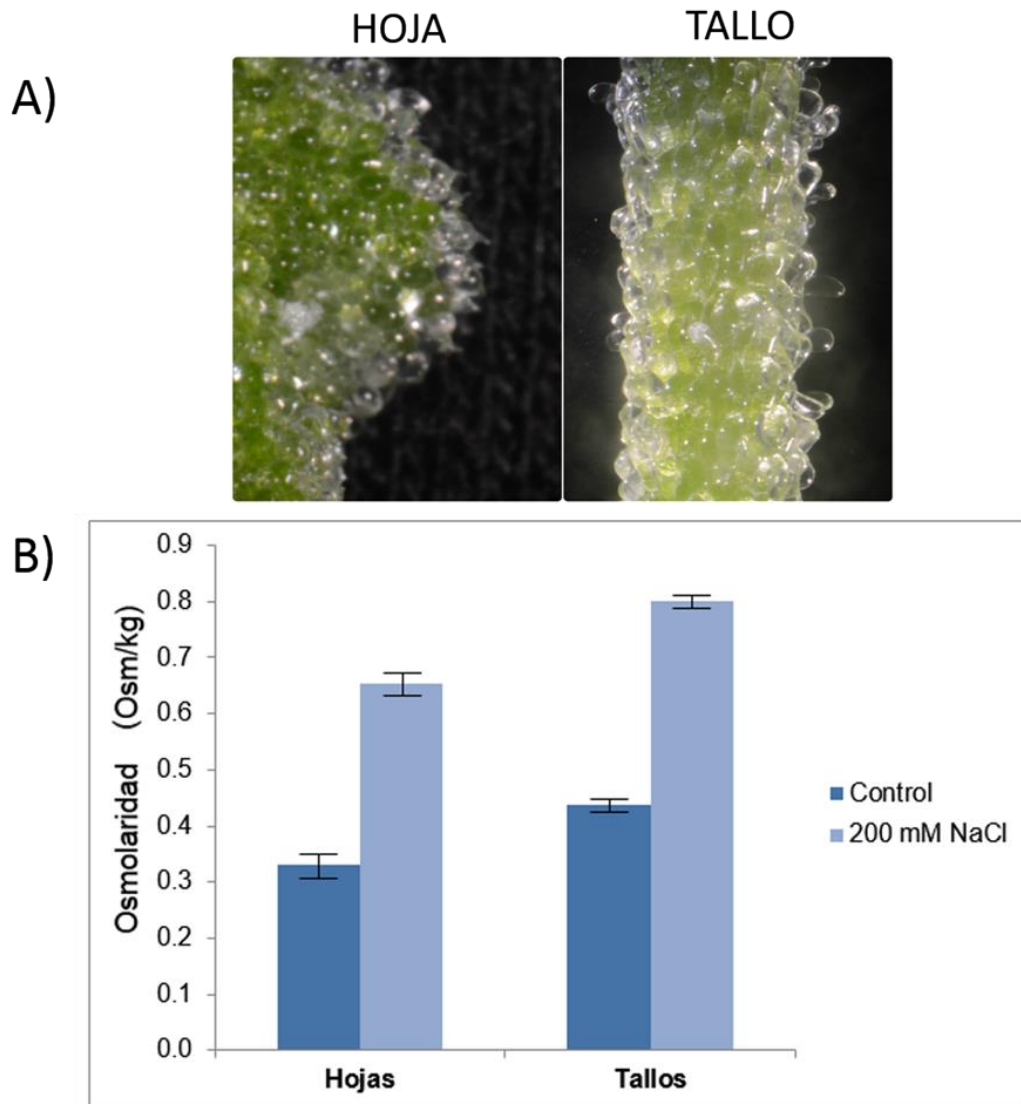


Figura 7. Osmolaridad en hojas y tallos de *M. crystallinum*. **A)** Tejido aéreo de plantas tratadas con 200 mM NaCl, la osmolaridad de la savia extraída de estos tejidos se midió con un osmómetro. **B)** Osmolaridad de hojas y tallos de plantas control y plantas expuestas a 200 mM NaCl; los datos corresponden a la media \pm DE de tres experimentos independientes.

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS MICROSOMALES DE HOJAS DE *M. crystallinum*

Las membranas microsomales son pequeñas vesículas, originadas a partir de las membranas del complejo de Golgi, el plasmalema, el tonoplasto, el cloroplasto, la mitocondria y el retículo endoplásmico, que se forman cuando las células se lisan y homogenizadas en un medio iso-osmótico. El aislamiento de membranas microsomales de hojas de plantas de ocho semanas de edad de *M. crystallinum*, se efectuó tanto con plantas crecidas en condiciones control como expuestas a salinidad (200 mM de NaCl) por un periodo de dos semanas.

Para el aislamiento de la fracción correspondiente al tonoplasto se utilizó electroforesis zonal de flujo libre (FFZE), siguiendo el protocolo reportado por Barkla *et al.* (2009) que sugiere el uso de muestras de membranas microsomales con concentraciones ≥ 3 mg/ml. Para alcanzar esta concentración, se aislaron microsomas a partir de aproximadamente 1,300 g de tejido vegetal, que se dividió en 21 preparaciones independientes de 60 g de hojas por extracción. El rendimiento promedio de la extracción, que fue de 0.71 mg proteína g⁻¹ de tejido vegetal, resalta el hecho de que los tejidos vegetales son notoriamente recalcitrantes a la extracción de proteínas de membrana.

El perfil de las proteínas contenidas en cada una de las muestras obtenidas se determinó mediante un análisis por 1D-SDS-PAGE; Este procedimiento sirvió para verificar la integridad de las muestras y a su vez, para confirmar que las muestras fueran homogéneas, es decir, con un perfil similar de proteína en el gel. Aquellas muestras que no cumplieron con este criterio se descartaron. El perfil de proteínas microsomales correspondiente a dos muestras para cada condición que se utilizaron para el siguiente fraccionamiento, se muestra en la Figura 8.

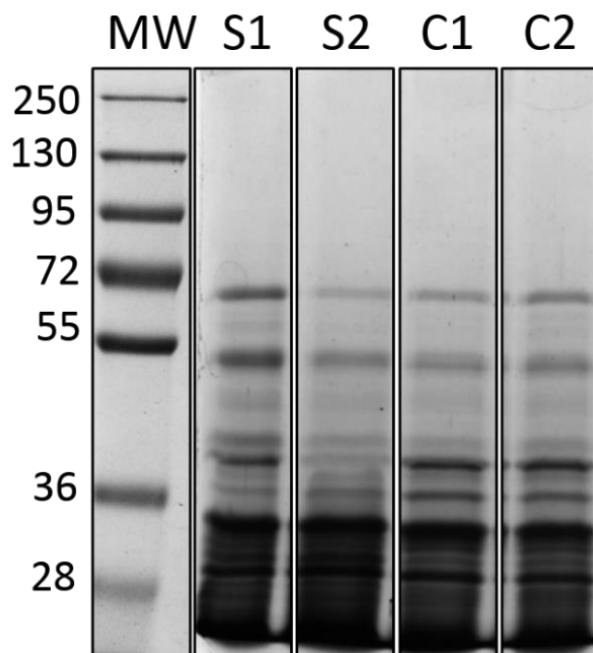


Figura 8. Análisis 1D-SDS-PAGE de membranas microsomales de *M. crystallinum*. Se seleccionaron dos muestras microsomales al azar para cada condición de las que 15 μg de proteína se resolvieron en un gel de acrilamida al 10% de. Dicho gel, teñido con azul de Coomassie, es el que se muestra en la imagen; **MW**, Marcador de peso molecular en kDa; **S1** y **S2**; plantas tratadas con 200 mM NaCl, **C1** y **C2**, plantas control.

ENRIQUECIMIENTO DE TONOPLASTO DE *M. crystallinum* MEDIANTE ELECTROFORESIS ZONAL DE FLUJO LIBRE (FFZE).

Una de las dificultades más frecuentes en un análisis proteómico, es la presencia de proteínas “contaminantes”, que en el caso de proteínas de una membrana en particular, están representadas por membranas celulares erróneamente asignadas a la estructura o endomembrana de interés (Millar *et al.*, 2004).

Con el uso de los métodos tradicionales de separación empleando centrifugación fraccionada y cromatografía generalmente se obtienen fracciones que suelen no ser muy puras (Righetti *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008). Afortunadamente, varias técnicas con ventajas muy significativas para resolver los problemas de

contaminación, están siendo introducidas con éxito en estudios de proteómica de plantas, entre estos destaca la electroforesis zonal de flujo libre (FFZE).

La FFZE es un procedimiento electroforético sin gel, muy versátil y útil para separar partículas cargadas, incluyendo, péptidos, proteínas, membranas u organelos, a través de un flujo laminar de medio dentro de una cámara formada por dos placas de vidrio. La aplicación de alto voltaje perpendicular al flujo de muestra, genera un campo eléctrico que conduce a la separación de los distintos componentes de la muestra en base a su carga, en 96 distintas fracciones, que resulta en un perfil de separación de muy alta resolución y con un alto grado de pureza (Weber & Wildgruber, 2008). En el caso particular de mezclas complejas de membranas subcelulares (microsomos), la separación por FFZE se da en base a la carga superficial neta de la membrana, la cual se atribuye a las proteínas y cabezas polares de los lípidos que las conforman, por lo tanto, es específica para cada tipo de membrana subcelular. Esta técnica de fraccionación ha sido previamente aplicada con éxito en plantas para aislar tonoplasto en *M. crystallinum* (Barkla *et al.*, 2007), mitocondrias (Eubel *et al.*, 2007) y el aparato de Golgi (Parsons *et al.*, 2012).

En este estudio, se empleó la técnica de FFZE para el aislamiento de fracciones enriquecidas del tonoplasto, siguiendo la metodología descrita por Barkla *et al.*, 2007 y 2009. Anteriormente, se demostró que la adición de 3 mM Mg-ATP a las membranas microsomales antes de su paso por el sistema de FFZE, que provoca que la carga superficial del tonoplasto se vuelva negativa como resultado del bloqueo de las cargas positivas por el ATP (Barkla *et al.*, 2007), resulta en la migración del tonoplasto hacia el electrodo positivo. En tales condiciones, se ha reportado que las fracciones que constituyen el primer pico en el perfil de separación están enriquecidas en proteínas del tonoplasto (Barkla *et al.*, 2009). Para el presente estudio, se decidió coleccionar y mezclar diez fracciones (12 a 21) correspondientes al primer pico del perfil de separación (Fig. 9).

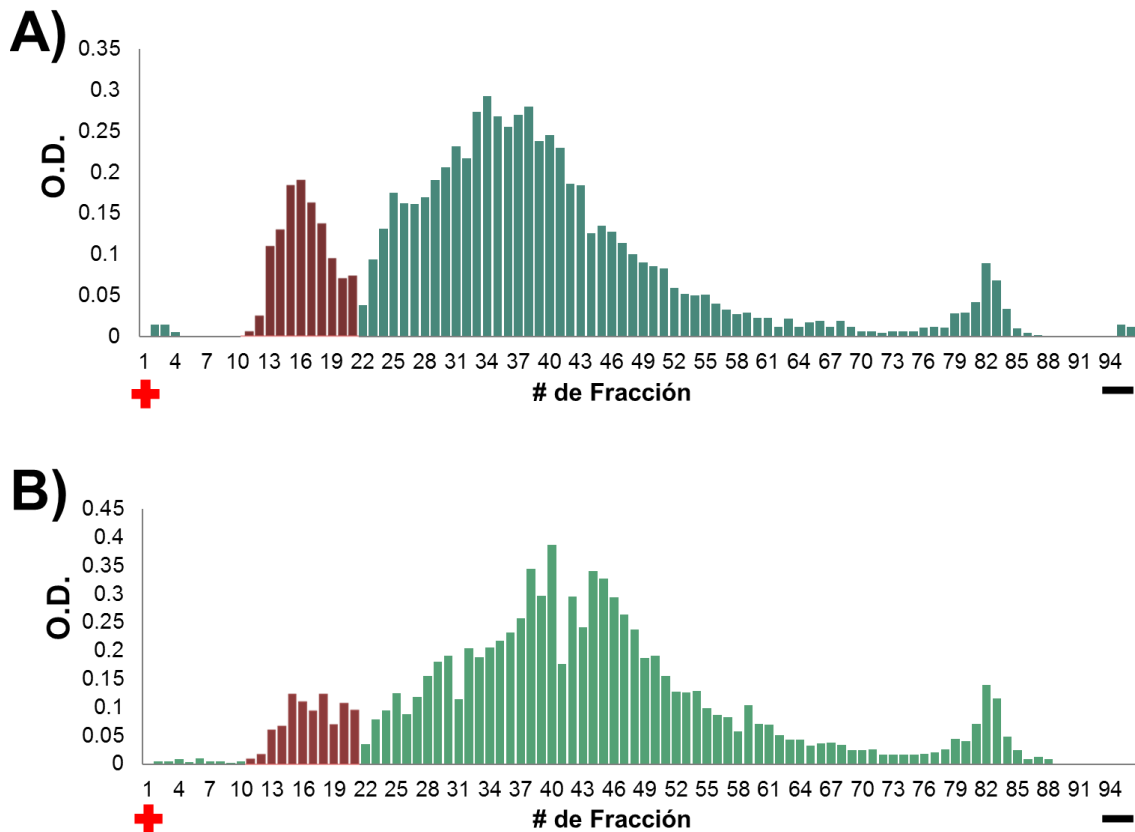


Figura 9. Perfil de proteínas microsomales de plantas de *M. crystallinum* separadas en 96 fracciones mediante el sistema FFZE. La cantidad de proteína de cada fracción colectada para el promedio de tres réplicas biológicas se muestra en unidades de densidad óptica (O.D.) a una longitud de onda de 280 nm. Los signos positivo (+) y negativo (-) en el eje X simbolizan el campo eléctrico generado dentro de la cámara de separación del equipo FFZE. Las fracciones seleccionadas para su posterior análisis se muestran en rojo. **A)** Separación de membranas microsomales de plantas control; **B)** Separación de membranas microsomales de plantas tratadas con 200 NaCl.

Para confirmar el origen y la pureza de las membranas, las fracciones 12–21 de membranas microsomales de *M. crystallinum* colectadas mediante FFZE, se sometieron a análisis por 1D-SDS-PAGE y Western Blot, usando un anticuerpo contra una proteína que se encuentra enriquecida en el tonoplasto, la subunidad E de la V-ATPasa (VHA-E) (Fig. 10). El análisis 1D-SDS-PAGE reveló que el patrón y la intensidad de las bandas fueron diferentes para cada condición, lo cual indica de manera cualitativa la variación en el contenido proteico de las fracciones por el tratamiento con sal. Dentro del gel teñido con azul de Commassie, fue posible observar que la intensidad de algunas bandas disminuyó en las muestras tratadas

con NaCl (Fig. 10A – flechas rojas), pero otras aumentaron (Fig. 10A – flechas azules). Por su parte, en el análisis tipo Western Blot fue posible detectar la presencia de la VHA-E, confirmando el origen tonoplástico de estas fracciones membranales, interesantemente la acumulación de esta proteína parece incrementarse en condiciones de salinidad (Fig. 10B). Estas observaciones soportan la idea de que existen proteínas en el tonoplasto cuya expresión es variable en condiciones de estrés, sin embargo, no arrojan ninguna información concreta sobre los cambios cuantitativos que se observan a simple vista, ni sobre la identidad de estas proteínas. De tal manera, para profundizar en el análisis del proteoma del tonoplasto en respuesta a salinidad, es necesario emplear un enfoque basado en técnicas de proteómica cuantitativa.

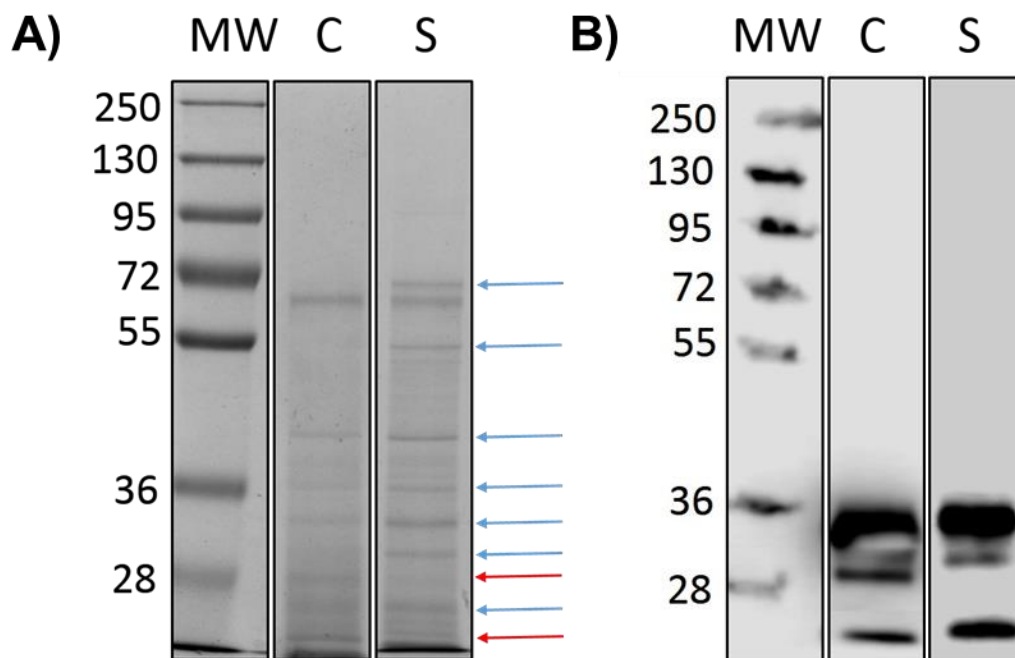


Figura 10. Análisis 1D-SDS-PAGE e inmunoblot de las fracciones colectadas mediante FFZE. **A)** Perfil 1D-SDS-PAGE de las fracciones colectadas mediante FFZE; 10 μ g de proteína se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%; **B)** Análisis tipo Western Blot de las fracciones 12-21 aislado mediante FFZE, las proteínas se incubaron con un anticuerpo contra la subunidad VHA-E (28 kDa) de la V-ATPasa, el cual es un marcador de proteínas del tonoplasto; **MW**, Marcadores de peso molecular en kDa; **S**, plantas tratadas con 200 mM NaCl; **C**, plantas sin tratar – Control

PROTEÓMICA CUANTITATIVA SIN MARCA (LABEL-FREE) DE TONOPLASTO DE *M. crystallinum*.

Para realizar el análisis proteómico de las muestras del tonoplasto, la proteína contenida en las fracciones 12-21 se precipitó con TCA y se recuperó mediante centrifugación, la pastilla resultante se envió para su análisis por LC-MS/MS. Para la identificación de proteínas, los datos derivados del análisis LC-MS/MS se procesaron empleando la base de datos de proteínas correspondiente a plantas verdes, *Viridiplantae* (Versión *Viridiplantae_txid33090*, 677,107 entradas), aplicando como criterios de identificación que cada péptido pudiera identificarse con una probabilidad mayor del 95%, y cada proteína se identificara con una probabilidad mayor al 99%, esto permitió identificar 530 proteínas a través de tres réplicas biológicas. De este total, una fracción de 293 proteínas (55%) se identificaron con al menos dos péptidos únicos en por lo menos dos de las tres replicas biológicas analizadas. Hay que mencionar que este número no representa todas las proteínas del tonoplasto, sino muy probablemente las proteínas que se expresan en mayor cantidad en estas fracciones.

Del total de proteínas identificadas, 39 fueron proteínas que se reprimieron por efecto de salinidad, ya que sólo fue posible identificarlas en la muestra control, por otra parte, 17 proteínas corresponden a proteínas inducidas por salinidad, ya que sólo fueron detectadas en la muestra tratada con sal (Fig. 11). Con el objetivo de obtener más información acerca de la función, localización y dominios estructurales de cada una de las proteínas identificadas, se realizó un proceso de anotación con el software BLAST2GO (Ver. 2.8) (Conesa & Götz, 2008), a partir de la información rescatada del Gene Ontology (GO) (Harris *et al.* 2004).

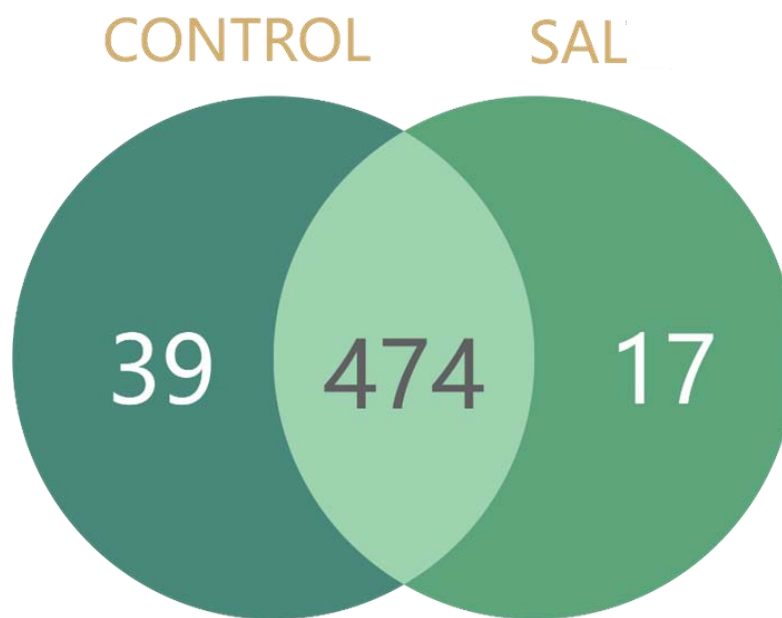


Figura 11. Distribución de las proteínas identificadas mediante análisis LC-MS/MS en las fracciones enriquecidas en tonoplasto. Se identificaron 530 proteínas, de las que el 89% (474) están presentes en ambas condiciones, el 3% (17) son inducidas por salinidad y el 7% (39) son reprimidas por este tratamiento.

Para determinar la ubicación subcelular de cada proteína identificada, se usó la información obtenida a partir de las anotaciones GO, la cual posteriormente fue corroborada manualmente con la anotación correspondiente en la base de datos SwissProt (<http://web.expasy.org/docs/swiss-prot>). La ubicación celular de las proteínas se muestra en la Figura 12A. De acuerdo a este análisis, la mayoría de las proteínas identificadas se localizan en el citoplasma (37%) y en el cloroplasto (22%); mientras que sólo el 7% de las proteínas identificadas están localizadas en la vacuola (Fig. 12A). Además, un pequeño grupo de proteínas que también podrían estar implicadas en la tolerancia a salinidad y por ende resultan de interés, son aquellas localizadas en las vesículas y endosomas (4%). Los datos anteriores indican que muchas otras proteínas migran al mismo lugar que el tonoplasto, sobre todo aquellas que pertenecen al cloroplasto y al citoplasma, representado contaminación de la muestra.

No obstante, se conoce que algunas proteínas citoplasmáticas están fuertemente asociadas al tonoplasto, como es el caso de algunas de las enzimas glicolíticas,

además, se ha observado que estas proteínas, regularmente consideradas contaminación, tienen una función importante en la regulación de la actividad de la V-ATPasa (Schmidt *et al.*, 2007; Barkla *et al.*, 2009). También, es importante mencionar que dentro de las proteínas citoplasmáticas identificadas se encuentran 12 de las 28 subunidades del proteosoma, siete subunidades (α y β) del núcleo 20s y cinco de las subunidades del complejo regulatorio 19s.

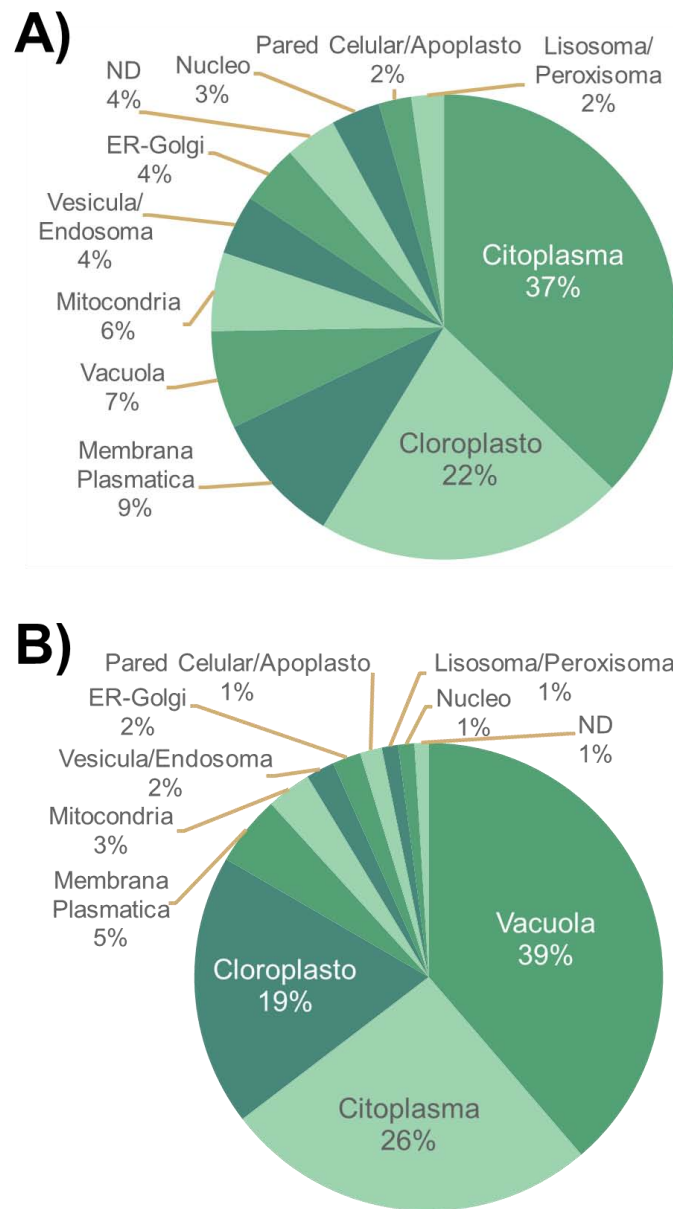


Figura 12. Localización subcelular de las proteínas identificadas y clasificación de los espectros contados. La localización se obtuvo a partir de la información de las

anotaciones GO y SwissProt. **A)** Localización subcelular y porcentaje de proteínas identificadas. **B)** Localización subcelular y porcentaje de los espectros contados de un total de 18,166 espectros detectados en las muestras.

Por el contrario, al realizar el conteo de espectros en las muestras, el cual permite cuantificar la cantidad de cada proteína presente, se contabilizaron en total 18,166 espectros, de los cuales la mayoría se asociaron con la vacuola (39%), el citoplasma (26%) y el cloroplasto (19%) (Fig. 12B). El conteo de espectros permitió identificar y contabilizar 11 subunidades de la V-ATPasa tanto del sector periférico V₁, como del sector transmembranal V₀, así como varias isoformas. Este complejo por sí solo representó el 34% de la proteína total en la muestra (Tabla 3). Además, fue cuantificada en gran cantidad la pirofosfatasa vacuolar, representando más del 2% del total de espectros en la muestra. A pesar de que el mayor número de proteínas identificadas se asignaron al citoplasma, la mayor cantidad de espectros, por lo tanto de proteína, se situó en la vacuola, confirmando que las fracciones colectadas efectivamente estaban enriquecidas en tonoplasto.

Tabla 3. Conteo de espectros de las subunidades de la V-ATPasa.

| | ESPECTROS % DEL TOTAL | |
|----------------------|-----------------------|--------------|
| V-ATPasa subunidad B | 2173 | 12.0% |
| V-ATPasa subunidad A | 1938 | 10.7% |
| V-ATPasa subunidad E | 694 | 3.8% |
| V-ATPasa subunidad d | 425 | 2.3% |
| V-ATPasa subunidad H | 315 | 1.7% |
| V-ATPasa subunidad D | 209 | 1.2% |
| V-ATPasa subunidad C | 192 | 1.1% |
| V-ATPasa subunidad c | 80 | 0.4% |
| V-ATPasa subunidad a | 77 | 0.4% |
| V-ATPasa subunidad G | 57 | 0.3% |
| V-ATPasa subunidad F | 53 | 0.3% |
| TOTAL | 6230 | 34.2% |

Se contó el total de espectros en la muestra para cada una de las subunidades, las diferentes isoformas identificadas se agruparon. El complejo característico de tonoplasto representa el 34% de la proteína, de un total de 18,166 espectros en la muestra.

Para determinar la función de las proteínas identificadas, se obtuvieron las asignaciones funcionales GO, que después fueron verificadas y curadas manualmente, para finalmente clasificarlas en 13 grupos funcionales (Fig. 13 A). En la gráfica de función de las proteínas identificadas, cabe destacar la sobrerrepresentación del proceso de transporte, donde se observaron proteínas interesantes, incluyendo la V-ATPasa, la pirofosfatasa vacuolar, dos acuaporinas (PIP2;8 y PIP1;4) y un sinnúmero de transportadores, entre los que se incluyen transportadores de la familia ABC. La presencia de proteínas implicadas tanto en la homeostasis de iones como en el transporte de agua y otros compuestos, concuerda con los procesos bioquímicos conocidos que están involucrados en la tolerancia a salinidad (Deinlein *et al.*, 2014).

Por otra parte, las proteínas involucradas en procesos catabólicos y de generación de energía también se encuentran sobrerrepresentadas, particularmente aquellas del metabolismo de carbohidratos, incluyendo diez de las enzimas glicolíticas, principalmente la enolasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Además, se encontraron enzimas involucrados en el metabolismo CAM presentes en gran cantidad, entre las que se incluye una isoforma específica de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la malato deshidrogenasa y la enzima málica dependiente de NADPH, observaciones que están de acuerdo con reportes anteriores a nivel de transcrito (Schmidt *et al.*, 2007; Cushman & Bohnert, 1989; 1999). Esta información sugiere que se requiere una gran cantidad de energía para llevar a cabo el proceso de transporte. La organización celular fue otra categoría representativa en la muestra, proteínas como la dinamina y la tubulina fueron identificadas; el activo proceso de remodelación celular puede ser un indicativo de los cambios morfológicos que se presentan en plantas expuestas al NaCl. También se clasificaron en base a su función cada uno de los espectros contados en la muestra. En la Figura 13B se observa que la mayor parte de estos se asociaron a mecanismos de transporte (23%); las categorías de metabolismo de carbohidratos y generación de energía cubrieron el 21% del total espectros, finalmente el proceso de desarrollo y crecimiento parece también ser importante, representado un 17% del total de espectros.

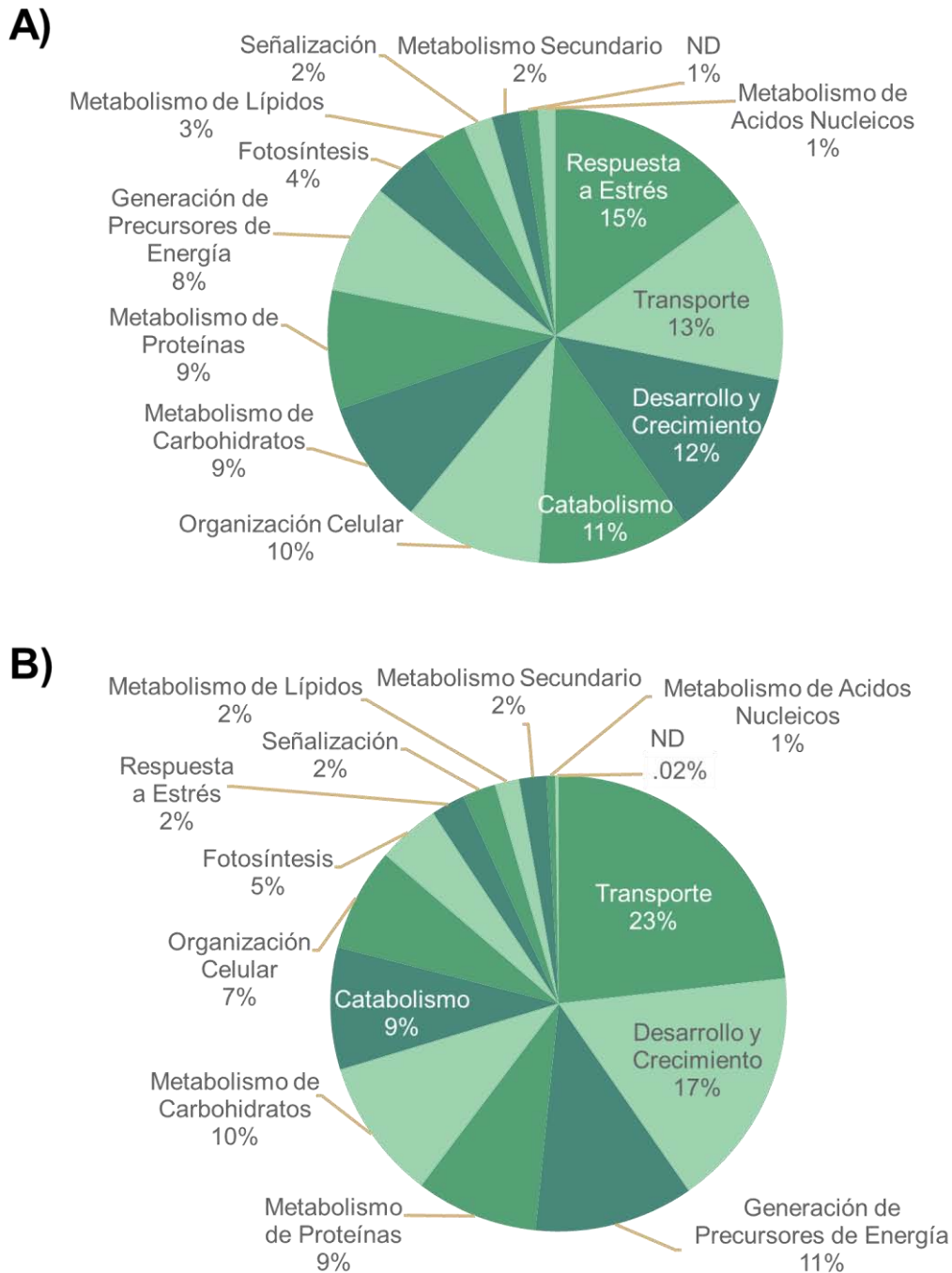


Figura 13. Procesos biológicos en los que participan las proteínas identificadas y los espectros contados. La asignación funcional GO de las proteínas identificadas se realizó utilizando el software BLAST2GO y luego fue verificada manualmente. **A)** Procesos biológicos en los que se involucran las proteínas identificadas. **B)** Procesos biológicos en los que se involucran los espectros contados (18,166).

Si bien las asignaciones GO pueden dar una idea de la función y localización de las proteínas identificadas, algunas de estas asignaciones se basan en la predicción y no poseen evidencia experimental concreta; también la múltiple localización celular y función asociadas a algunas proteínas representa un gran problema al momento de clasificarlas.

Con la idea de obtener más información sobre las propiedades de las proteínas identificadas, se determinó la localización de las proteínas a nivel de membrana (Fig. 14A). Para esto se utilizaron tres criterios, en el primero se consideró usar la localización celular del registro de SwissProt, el segundo fue usar la localización correspondiente a la anotación GO, finalmente empleando el software BLAST2GO, se realizó el análisis de dominios en las proteínas identificadas, para esto el programa hace uso del servidor PHOBIUS (Käll *et al.*, 2004) para realizar la búsqueda de posibles dominios transmembranales dentro de las secuencias de las proteínas. Cuando se encontraron dominios transmembranales en una proteína por medio de PHOBIUS, la proteína fue considerada como integral de membrana, en el caso de no encontrar dominios transmembranales, una proteína se consideró asociada a la membrana cuando la anotación de SwissProt o la anotación GO asignó la localización en alguna membrana, finalmente aquellas proteínas sin dominios de membrana y cuya localización no ha sido reportada como asociada a membranas, fueron consideradas como solubles.

Mediante este análisis se logró determinar que 21% de las proteínas fueron proteínas integrales de membrana; en este grupo se incluyen las subunidades correspondientes al sector membranal V_0 de la V-ATPasa y la pirofosfatasa vacuolar; por otra parte, las subunidades del dominio periférico V_1 fueron agrupadas como asociadas a la membrana, ya que en su secuencia no contienen dominios transmembranales. El 53% de las proteínas identificadas no se localizan en la membrana, dentro de este grupo podemos encontrar las enzimas glicolíticas y aquellas relacionadas con el metabolismo CAM. En el caso particular de la enolasa y la aldolasa, se ha reportado que estas se asocian al dominio V_1 de la V-ATPasa

para regular su actividad (Barkla *et al.*, 2009), sin embargo, las bases de datos aún no han considerado esta información.

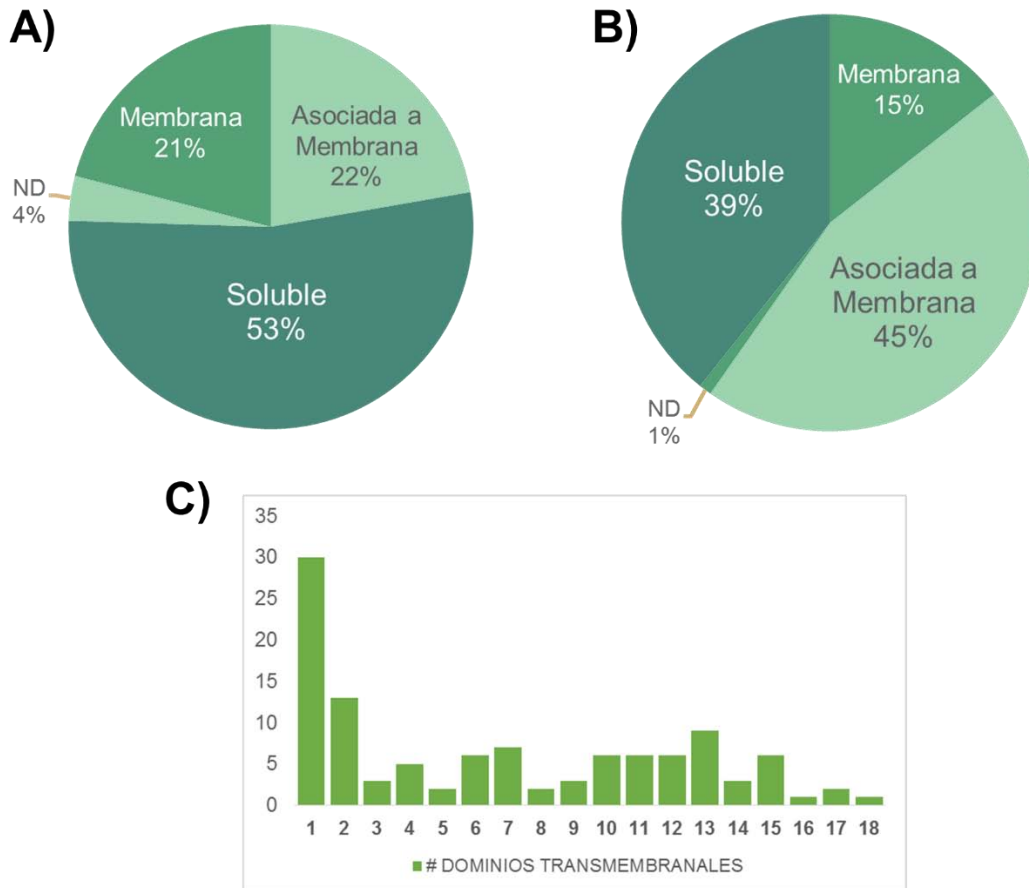


Figura 14. Clasificación de las proteínas identificadas y de los espectros contados en base a la presencia de posibles dominios transmembranales. La información contenida en tres diferentes bases de datos fue usada para la clasificación. **A)** Porcentajes de proteínas asociadas a una membrana. **B)** Porcentaje de espectros de proteínas asociados a una membrana del total de 18,166 espectros contados en las muestras. **C)** Agrupación de las 111 proteínas integrales de membrana identificadas de acuerdo al número de dominios transmembranales presentes.

En contraste, el conteo de espectros (Fig. 14B) reveló que la mayoría de estos (45%) se asociaron a proteínas de membrana, esto es porque las proteínas más abundantes fueron las que conforman el dominio V₁ de la V-ATPasa, el cual de acuerdo a nuestro criterio, se consideran como asociadas a la membrana; y como era de esperarse, el número de espectros de proteínas de membrana y proteínas

solubles disminuyó. Por último, se determinó el número de dominios transmembranales para las proteínas integrales de membrana identificadas; como se observa en la Figura 14C, la mayor parte de las proteínas se sitúan en tres grupos; en el primero se encuentran las proteínas que constan de uno a dos dominios transmembranales, entre las que destacan proteínas relacionadas con el tráfico vesicular, como lo son el receptor vacuolar 3, la proteína 711 asociada a vesículas, la ATPasa de vesículas, la calnexina y la fosfatasa de fosfoinosítidos SAC3. Dentro del segundo grupo se encontraron las proteínas que constan de seis a siete dominios transmembranales, entre las que se pudo identificar una acuaporina (PIP2:8) y varias subunidades del fotosistema II, como son las proteínas CP43, CP47, D1 y D2 (Umena *et al.*, 2011). Finalmente, en el tercer grupo se ubicaron las proteínas con más de diez dominios transmembranales, entre estas proteínas se encuentran un gran número de transportadores, como lo son algunos del tipo ABC subfamilia C (miembros 1, 2 y 4), transportadores iónicos de SO_4^{2-} , NH_4^+ , Cl^- , PO_4^{3-} y K^+ , así como el intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática (NHX7), además, dentro de este grupo también se encontraron tres isoformas de la ATPasa de membrana plasmática (PMA1, PMA3 y PMA4) y la pirofosfatasa vacuolar.

Con el objetivo de obtener un panorama general de los procesos que cambiaron de una condición a otra, se realizó un análisis de enriquecimiento para los procesos biológicos, la localización subcelular y la localización en una membrana entre una condición y otra, tomando como base el total de espectros contados. El análisis de enriquecimiento de localización subcelular (Tabla 4) reveló una disminución en la cantidad de proteína localizada en organelos como el cloroplasto (principalmente subunidades de los fotosistemas I y II), ER-Golgi (calnexina y “luminal binding proteins”), y la mitocondria (ATP sintasa y NADH deshidrogenasa); por el contrario, proteínas localizadas en la vacuola (subunidades de la V-ATPasa y los transportadores NRT y MCH1), el lisosoma (GDPA2 y 2-hidroxiácido oxidasa) y los endosomas (VPS29 y DNAJ), incrementaron su abundancia.

El análisis de enriquecimiento para los procesos celulares (Tabla 5), mostró un aumento en procesos como el transporte (generado principalmente por las diversas subunidades de la V-ATPasa) y el metabolismo de carbohidratos, donde se incluyen principalmente enzimas glicolíticas (como la enolasa y la G3PDH) y enzimas de la vía CAM, principalmente la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC); estos resultados confirman lo anteriormente mencionado sobre el gran requerimiento energético necesario para activar el transporte. También se registró un aumento en las proteínas relacionadas con la señalización intracelular, principalmente aquellas involucradas en el metabolismo del inositol; la inositol 3-fosfato sintasa y la fosfatasa SAC3, este hecho sugiere que en condiciones salinas se requiere un aumento en la expresión de proteínas señalizadoras, para coordinar y dirigir correctamente a su destino el exceso de cargos que se están transportando dentro de la célula. Finalmente, la categoría del metabolismo secundario también se incrementó, siendo la inositol 4-metiltransferasa la que se encuentra mayormente representada; esto debido a que en condiciones salinas se requiere un aumento de las proteínas involucradas en la síntesis de osmolitos y otros compuestos que protegen a la célula de los daños tóxicos del Na⁺.

Tabla 4. Enriquecimiento de las proteínas identificadas basado en su localización celular.

| | Control | Sal | Cambio | t-test |
|---------------------|---------|--------|--------|--------|
| Pared Celular | 55.7 | 35.7 | 0.6 | NS |
| Cloroplasto | 679.3 | 448.3 | 0.7 | NS |
| Citoplasma | 739.7 | 829.0 | 1.1 | NS |
| ER/Golgi | 80.3 | 38.3 | 0.5 | * |
| Mitocondria | 125.7 | 74.7 | 0.6 | NS |
| No Determinado | 28.7 | 30.3 | 1.1 | NS |
| Núcleo | 36.3 | 31.3 | 0.9 | NS |
| Lisosoma/Peroxisoma | 28.3 | 39.7 | 1.4 | * |
| Membrana Plasmática | 146.0 | 149.0 | 1.0 | NS |
| Vacuola | 844.0 | 1495.7 | 1.8 | NS |
| Vesícula/Endosoma | 48.0 | 71.3 | 1.5 | NS |

Se obtuvo el promedio de los espectros de las tres replicas biológicas para cada condición, después se calculó el cambio; este fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) ó $t < 0.01$ (**). **NS**, no significativo

Tabla 5. Enriquecimiento para los procesos biológicos de las proteínas identificadas.

| | Control | Sal | Cambio | t-test |
|--------------------------------------|---------|--------|--------|--------|
| Catabolismo | 980.7 | 1203.7 | 1.2 | NS |
| Desarrollo y Crecimiento | 1909.0 | 2399.7 | 1.3 | NS |
| Fotosíntesis | 597.3 | 518.0 | 0.9 | NS |
| Generación de Precursores de Energía | 1502.0 | 1342.7 | 0.9 | NS |
| Metabolismo de Ácidos Nucleicos | 79.0 | 76.0 | 1.0 | NS |
| Metabolismo de Carbohidratos | 1032.7 | 1495.3 | 1.4 | * |
| Metabolismo de Lípidos | 215.7 | 217.0 | 1.0 | NS |
| Metabolismo de Proteínas | 1120.3 | 1060.3 | 0.9 | NS |
| Metabolismo Secundario | 203.3 | 284.7 | 1.4 | NS |
| Organización Celular | 786.7 | 1059.0 | 1.3 | NS |
| Respuesta a Estrés | 269.9 | 340.1 | 1.3 | NS |
| Señalización | 230.7 | 360.3 | 1.6 | NS |
| Transporte | 2390.0 | 3464.0 | 1.4 | NS |
| No Determinado | 28.7 | 30.3 | 1.1 | NS |

Se obtuvo el promedio de los espectros de las tres replicas biológicas para cada condición, después se calculó el cambio; este fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*). **NS**, no significativo.

Por su parte, el análisis de enriquecimiento para las proteínas con base en su localización en membrana (Tabla 6), reveló un incremento en la cantidad de proteínas asociadas a membrana en condiciones de salinidad, este aumento estuvo principalmente representado por las distintas subunidades del complejo V_1 de la V-ATPasa y las enzimas relacionadas con el metabolismo del inositol previamente mencionadas; este hecho sugiere que algunos de los procesos mencionados anteriormente, como la señalización y generación de precursores energía, ocurren en mayor medida en la periferia de las membranas. Posiblemente estas proteínas periféricas se encuentren regulando y/o controlando la actividad de proteínas intrínsecas de membrana encargadas directamente del transporte.

Tabla 6. Análisis de enriquecimiento de las proteínas identificadas con base en su localización en una membrana.

| | Control | Sal | Cambio | t-test |
|---------------------|---------|--------|--------|--------|
| Membrana | 452.3 | 421.0 | 0.9 | NS |
| Asociada a Membrana | 1179.7 | 1622.7 | 1.4 | NS |
| No Determinado | 28.7 | 30.3 | 1.1 | NS |
| Soluble | 1102.7 | 1138.0 | 1.0 | NS |

Se obtuvo el promedio de los espectros de las tres replicas biológicas para cada condición, después se calculó el cambio; este fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) ó $t < 0.01$ (**). **NS**, no significativo.

Es conocido que la V-ATPasa juega un papel esencial en los mecanismos de tolerancia a la salinidad, por lo que se analizó la posibilidad de que hubiesen ocurrido cambios en la proporción de las diferentes subunidades de la V-ATPasa en las dos diferentes condiciones experimentales. Como se puede observar en la Tabla 7, se registró un aumento importante en la proporción de tres subunidades, VHA-d (1.5) involucrada en el ensamblaje y estabilidad del complejo V_0 , VHA-G (2.0), la cual se encarga de la unión entre el dominio V_1 y V_0 ; y VHA-F (1.6), cuya función es formar un puente entre ambos dominios para estabilizar su unión, estos resultados mostraron que la salinidad causó un cambio en la estequiometría de la V-ATPasa (Sze *et al.* 2002).

Los datos derivados de los análisis anteriores solamente mostraron un panorama general de lo que ocurre en el tonoplasto de las hojas de plantas expuestas a la salinidad, sin identificar un mecanismo en concreto, por esto fue necesario buscar proteínas individuales que mostraran un cambio significativo en su abundancia las cuales pudieran estar directamente relacionadas con la tolerancia a la salinidad.

Tabla 7. Análisis estequiométrico de la V-ATPasa

| | Control | Estequiometria (B) | Sal | Estequiometria (B) | Cambio t-test | |
|----------------------|---------|--------------------|-------|--------------------|---------------|----|
| V-ATPasa subunidad B | 238.7 | 1.0 | 485.7 | 1.0 | 1.0 | * |
| V-ATPasa subunidad A | 242.7 | 1.0 | 403.3 | 1.2 | 1.2 | NS |
| V-ATPasa subunidad E | 78.0 | 3.1 | 153.3 | 3.2 | 1.0 | * |
| V-ATPasa subunidad d | 46.7 | 5.1 | 62.0 | 7.8 | 1.5 | NS |
| V-ATPasa subunidad H | 31.0 | 7.7 | 74.0 | 6.6 | 0.9 | * |
| V-ATPasa subunidad D | 22.0 | 10.8 | 47.7 | 10.2 | 0.9 | * |
| V-ATPasa subunidad C | 21.3 | 11.2 | 42.7 | 11.4 | 1.0 | NS |
| V-ATPasa subunidad c | 10.3 | 23.1 | 16.3 | 29.7 | 1.3 | NS |
| V-ATPasa subunidad a | 11.0 | 21.7 | 20.3 | 23.9 | 1.1 | NS |
| V-ATPasa subunidad G | 9.3 | 25.6 | 9.7 | 50.2 | 2.0 | NS |
| V-ATPasa subunidad F | 7.7 | 31.1 | 10.0 | 48.6 | 1.6 | * |

Se calculó el promedio de la cantidad de espectros detectados para cada subunidad en tres replicas biológicas para cada una de las condiciones. Los radios estequiométricos fueron obtenidos tomando como referencia a la subunidad VHA-B. La cuantificación fue considerada confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) o $t < 0.01$ (**). **NS**, no significativo.

Para identificar aquellas proteínas que cambiaron su abundancia en respuesta al NaCl de manera significativa, se realizó un análisis cuantitativo basado en el conteo de espectros, esto quiere decir, que para cada proteína se contabilizó el número de espectros detectados en el análisis LC-MS/MS para cada condición, posteriormente se calculó el cambio en la abundancia entre las dos condiciones, empleando el método de conteo de espectros denominado Total Spectra (TS), el cual consiste simplemente en contar el número de espectros identificados para cada proteína. Para que este cambio se considerara significativo se tomaron en cuenta las proteínas cuya abundancia disminuyó por lo menos a la mitad, o por el contrario, que aumentó por lo menos al doble; además, estas proteínas deberían de cumplir con dos criterios, el primero que debería contener dos péptidos únicos en por lo menos dos replicas biológicas diferentes, el segundo que al aplicar la prueba estadística de t-test para los valores con los cuales se realizó la cuantificación, la confiabilidad del experimento debería de ser por lo menos del 95%. Con base en estas consideraciones, fue posible identificar 58 proteínas que respondieron a la salinidad, de las cuales 37 disminuyeron (Tabla 8) y 21 incrementaron (Tabla 9).

Tabla 8. Proteínas que disminuyeron su abundancia en condiciones de salinidad.

| UNIPROT ACC. | NOMBRE | ORGANISMO | LOCALIZACIÓN | PROCESO BIOLÓGICO | # PEPTIDOS | CAMBIO | t-TEST |
|------------------------------|---|--------------------|---------------------|--------------------------------------|------------|--------|--------|
| Fotosíntesis | | | | | | | |
| P08926 | Proteína alfa de unión a RuBisCO – subunidad mayor | P. sativum | Cloroplasto | Fotosíntesis | 2 | 0.09 | * |
| Q6EW26 | Fotosistema II CP47 | N. alba | Cloroplasto | Fotosíntesis | 4 | 0.2 | ** |
| Q2QD76 | Apocitochromo f | C. sativus | Cloroplasto | Fotosíntesis | 9 | 0.2 | * |
| Q09MI2 | Fotosistema II CP43 | C. sinensis | Cloroplasto | Fotosíntesis | 3 | 0.2 | * |
| Q9XF91 | Fotosistema II subunidad 22 kDa | A. thaliana | Cloroplasto | Fotosíntesis | 3 | 0.2 | * |
| P41343 | Ferredoxina - NADP reductasa | M. crystallinum | Cloroplasto | Fotosíntesis | 9 | 0.2 | * |
| P83755 | Fotosistema II subunidad D1 | A. thaliana | Cloroplasto | Fotosíntesis | 7 | 0.2 | * |
| Q1KXV9 | Fotosistema I P700 apoproteína A1 | H. annuus | Cloroplasto | Fotosíntesis | 8 | 0.3 | ** |
| P07369 | Proteína 3C de unión a clorofila a-b | S. lycopersicum | Cloroplasto | Fotosíntesis | 7 | 0.3 | * |
| P48417 | Aleno oxidado sintasa | L. usitatissimum | Cloroplasto | Fotosíntesis | 3 | 0.5 | ** |
| A0A334 | Fotosistema I P700 apoproteína A2 | C. arabica | Cloroplasto | Fotosíntesis | 9 | 0.5 | * |
| Síntesis de ATP | | | | | | | |
| Q09FX6 | ATP sintasa subunidad alfa | N. domestica | Cloroplasto | Generación de Precursores de Energía | 2 | 0 | * |
| Q9FNN5 | NADH deshidrogenasa flavoproteína 1 | A. thaliana | Mitocondria | Generación de Precursores de Energía | 3 | 0.08 | * |
| B1NWD5 | ATP sintasa subunidad alfa | M. esculenta | Cloroplasto | Generación de Precursores de Energía | 19 | 0.3 | * |
| Q09G39 | ATP sintasa subunidad beta | P. occidentalis | Cloroplasto | Generación de Precursores de Energía | 24 | 0.3 | ** |
| Q9SK66 | NADH deshidrogenasa alfa subunidad 9 | A. thaliana | Mitocondria | Generación de Precursores de Energía | 3 | 0.4 | * |
| Q01915 | ATP sintasa subunidad alfa | G. max | Mitocondria | Generación de Precursores de Energía | 2 | 0.5 | ** |
| Traducción | | | | | | | |
| P09596 | 50S proteína ribosomal L14 | S. oleracea | Cloroplasto | Metabolismo de Proteínas | 3 | 0.1 | * |
| P34788 | 40S proteína ribosomal S18 | A. thaliana | Citoplasma | Metabolismo de Proteínas | 2 | 0.3 | * |
| P49215 | 40S proteína ribosomal S17 | S. lycopersicum | Citoplasma | Metabolismo de Proteínas | 3 | 0.3 | * |
| Q9LHP1 | 60S proteína ribosomal L7-4 | A. thaliana | Citoplasma | Metabolismo de Proteínas | 4 | 0.4 | * |
| Q9FJA6 | 40S proteína ribosomal S3-3 | A. thaliana | Citoplasma | Metabolismo de Proteínas | 7 | 0.4 | * |
| Síntesis de Proteínas | | | | | | | |
| Q39817 | Calnexina homólogo | G. max | ER-Golgi | Metabolismo de Proteínas | 2 | 0.08 | ** |
| Q944K2 | Dolicil-difosfooligosacarido-glicosiltransferasa subunidad 48 kDa | A. thaliana | ER-Golgi | Metabolismo de Proteínas | 3 | 0.2 | * |
| Q94II3 | Probable metiltransferasa PMT21 | A. thaliana | ER-Golgi | Metabolismo de Proteínas | 2 | 0.2 | ** |
| Q39817 | Calnexina homólogo | G. max | ER-Golgi | Metabolismo de Proteínas | 2 | 0.2 | * |
| Q940J9 | Probable metiltransferasa PMT8 | A. thaliana | ER-Golgi | Metabolismo de Proteínas | 4 | 0.4 | * |
| Q03684 | Proteína Luminal-binding 4 | N. tabacum | ER-Golgi | Metabolismo de Proteínas | 2 | 0.4 | * |
| Q40401 | Calreticulina | N. plumbaginifolia | ER-Golgi | Metabolismo de Proteínas | 4 | 0.4 | * |
| Q42434 | Proteína Luminal-binding | S. oleracea | ER-Golgi | Metabolismo de Proteínas | 11 | 0.4 | ** |
| Transporte | | | | | | | |
| P42056 | Porina 36 kDa de membrana mitocondrial externa | S. tuberosum | Mitocondria | Transporte | 2 | 0.09 | * |
| Q54XK2 | Sec61 subunidad alfa | D. discoideum | ER-Golgi | Transporte | 5 | 0.2 | * |
| Q9LZJ5 | Transportador ABC C-14 | A. thaliana | Membrana Plasmática | Transporte | 2 | 0.2 | * |
| Q7XPY2 | ATPasa de membrana plasmática | O. sativa | Membrana Plasmática | Transporte | 9 | 0.2 | ** |
| Q9C5M0 | Transportador DTC mitocondrial | A. thaliana | Mitocondria | Transporte | 4 | 0.4 | * |
| Q9LYS2 | Transportador ABC C-10 | A. thaliana | Membrana Plasmática | Transporte | 3 | 0.5 | ** |
| Metabolismo DNA | | | | | | | |
| P19177 | Histona H2A | P. crispum | Núcleo | Metabolismo de Acidos Nucleicos | 2 | 0 | * |

56

Las proteínas elegidas cumplieron los siguientes criterios: disminución < 0.5 veces, dos péptidos únicos en dos réplicas diferentes, el cambio fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) ó $t < 0.01$ (**).

Tabla 9. Proteínas que incrementaron su abundancia en condiciones de salinidad.

| UNIPROT ACC. | NOMBRE | ORGANISMO | LOCALIZACIÓN | PROCESO BIOLÓGICO | # PÉPTIDOS | CAMBIO | t-TEST |
|-----------------------------------|---|-----------------|---------------------|---------------------------|------------|--------|--------|
| Subunidades de la V-ATPasa | | | | | | | |
| Q9LX65 | V-ATPasa subunidad H | A. thaliana | Vacuola | Transporte | 2 | 2 | * |
| Q9XGM1 | V-ATPasa subunidad D | A. thaliana | Vacuola | Transporte | 11 | 2 | * |
| Q40078 | V-ATPasa subunidad B | A. thaliana | Vacuola | Transporte | 34 | 2.1 | * |
| Q40272 | V-ATPasa subunidad E | A. thaliana | Vacuola | Transporte | 18 | 2.3 | * |
| Glicólisis | | | | | | | |
| Q43130 | Enolasa | M. crystallinum | Citoplasma | Metabolismo Carbohidratos | 19 | 2 | * |
| P93262 | Fosfoglucomutasa | M. crystallinum | Citoplasma | Metabolismo Carbohidratos | 6 | 2.1 | * |
| P48491 | Triosafosfato isomerasa | A. thaliana | Citoplasma | Metabolismo Carbohidratos | 3 | 2.8 | * |
| Q1WIQ6 | Glyceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa | A. thaliana | Citoplasma | Metabolismo Carbohidratos | 6 | 5 | * |
| Metabolismo CAM | | | | | | | |
| P10490 | Fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 | M. crystallinum | Citoplasma | Metabolismo Carbohidratos | 44 | 2 | * |
| P37223 | Enzima málica dependiente de NADP | M. crystallinum | Citoplasma | Metabolismo Carbohidratos | 17 | 3 | * |
| P46645 | Aspartato aminotransferasa, isozyma 1 | A. thaliana | Citoplasma | Metabolismo Carbohidratos | 3 | 6.8 | * |
| Tráfico Vesicular | | | | | | | |
| A7T167 | Homólogo GDAP2 | S. lycopersicum | Peroxisoma/Lisosoma | Transporte | 2 | 4.4 | * |
| F4IVL6 | DnaJ subfamilia C | A. thaliana | Vesícula/Endosoma | Transporte | 2 | 5.2 | * |
| Q9STT2 | Vps 29 | A. thaliana | Vesícula/Endosoma | Transporte | 3 | 8.3 | ** |
| A7T167 | Homólogo GDAP2 | S. itálica | Peroxisoma/Lisosoma | Transporte | 3 | 11 | * |
| Metabolismo del Inositol | | | | | | | |
| Q7XZU2 | Fosfatasa de fosfoinosítido SAC3 | A. thaliana | Vacuola | Señalización | 4 | 2.6 | * |
| P45986 | Inositol 4-metiltransferasa | M. crystallinum | Citoplasma | Respuesta a Estrés | 12 | 8.9 | ** |
| Q40271 | Inositol 3-fosfato sintasa | M. crystallinum | Citoplasma | Señalización | 10 | 12 | * |
| Transportadores | | | | | | | |
| Q6CGU8 | Probable transportador MCH1 | C. sativus | Vacuola | Transporte | 3 | 2.2 | * |
| P46032 | Transportador NRT1/ PTR 8.3 | A. thaliana | Vacuola | Transporte | 3 | 2.6 | ** |
| Fotorespiración | | | | | | | |
| P05414 | (S)-2-hidroxi-acido oxidasa | S. oleracea | Peroxisoma/Lisosoma | Respuesta a Estrés | 7 | 2.3 | * |

57

Las proteínas elegidas cumplieron los siguientes criterios: incremento > 2 veces, dos péptidos únicos en dos réplicas diferentes, el cambio fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) o $t < 0.01$ (**).

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PROTEÍNAS CUYA ABUNDANCIA DISMINUYÓ POR LA SALINIDAD

La anotación de términos GO para las 37 proteínas que disminuyeron su abundancia (Fig. 15A), mostró que el 30% de las proteínas están implicadas en la fotosíntesis; entre estas proteínas se encontraron diversos componentes del fotosistema I y II, así como de la maquinaria de síntesis de ATP. Las proteínas implicadas en la síntesis de proteínas, tanto a nivel ribosomal como a nivel ER-Golgi, también representaron un porcentaje importante de las proteínas que disminuyeron (35%), aquí se encuentran diversas proteínas ribosomales implicadas en la traducción, así como la calnexina, la calreticulina, algunas “luminal binding proteins” y metil transferasas, involucradas en el plegamiento y modificación postraducciona de proteínas. Por otra parte, el conteo de espectros (Fig. 15B), mostró que la mayor cantidad de las proteínas asociadas a ellos están involucrados en la fotosíntesis y en el metabolismo de proteínas, lo cual se relaciona directamente con lo observado en el análisis de enriquecimiento de función biológica para estas proteínas (Fig. 15C), donde la abundancia de las proteínas de los dos procesos celulares antes mencionados disminuyó entre el 70% y 60%, respectivamente, en condiciones de salinidad.

Las anotaciones de GO basadas en localización subcelular para las 37 proteínas que disminuyeron su abundancia (Fig. 16A), mostró que el 41% se localiza en el cloroplasto, mientras que un 24% se localiza en el complejo ER-Golgi; mientras que el conteo de espectros asociados a las proteínas que disminuyeron su abundancia reveló que la mayor cantidad estos se distribuye entre el cloroplasto (66%) y el complejo ER-Golgi (14%) (Fig. 16B). Las observaciones anteriores se pueden relacionar con el resultado del análisis de enriquecimiento de espectros para estas proteínas (Fig. 16C), donde se registró una disminución del 70% en la cantidad de espectros asociados con el cloroplasto y la red ER-Golgi en plantas tratadas con respecto a las no tratadas; este análisis también mostró una disminución significativa en proteínas relacionadas con la mitocondria, y la membrana plasmática.

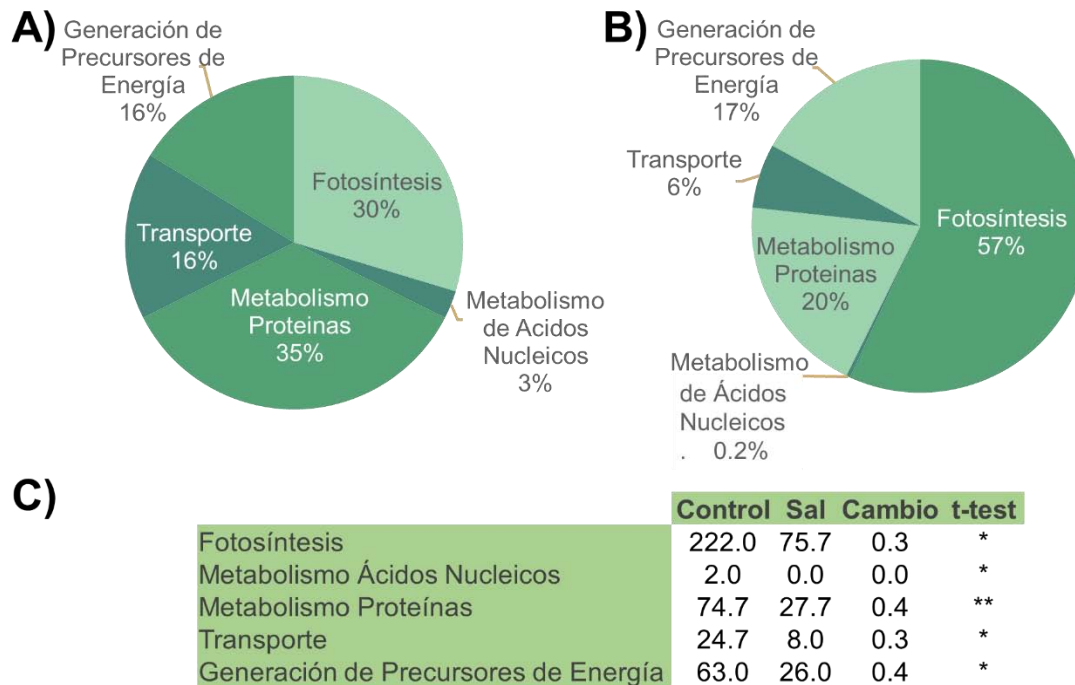


Figura 15. Procesos biológicos en los que participan las proteínas cuya abundancia disminuyó en respuesta a la salinidad y los espectros correspondientes a estas proteínas. A) Procesos biológicos en los que participan las proteínas que disminuyeron su abundancia. B) Procesos biológicos asociados a los espectros contados de las proteínas que disminuyeron su abundancia. C) Análisis de enriquecimiento con base en los procesos biológicos de las proteínas que disminuyeron su abundancia. Se obtuvo el promedio de los espectros de las tres replicas biológicas para cada condición, después se calculó el cambio y este fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) ó $t < 0.01$ ().**

Finalmente, se realizó el análisis de localización en membrana de las proteínas que disminuyeron en abundancia (Fig. 17A). Mediante este análisis fue posible observar que el mayor número de proteínas que disminuyeron correspondió a proteínas de membrana (44%), aunque las proteínas solubles también representaron un número importante (32%). El conteo de espectros (Fig. 17B), reveló que el mayor número correspondió a proteínas asociadas a membrana. El análisis de enriquecimiento mostró que los tres tipos de proteínas disminuyeron en 65% aproximadamente con respecto a la condición control (Fig. 17C).

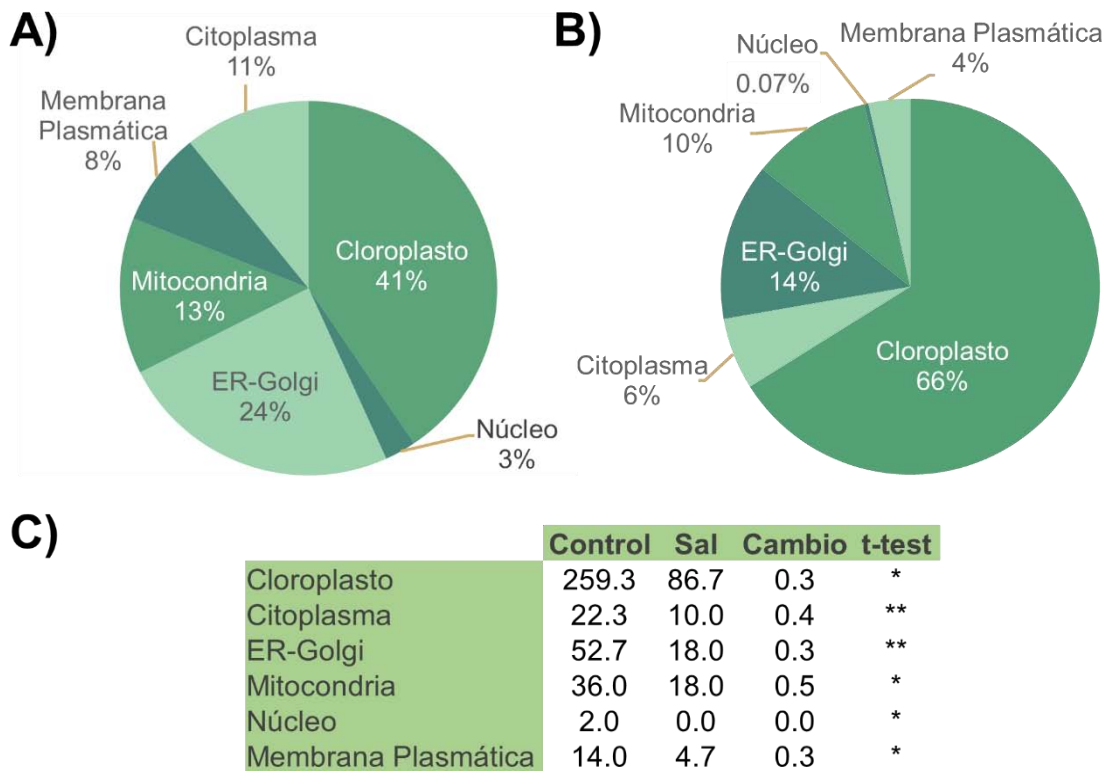


Figura 16. Localización subcelular de las proteínas que disminuyeron su abundancia en respuesta a la salinidad y los espectros asociados a estas proteínas. A) Localización subcelular de las proteínas que disminuyeron su abundancia. B) Localización subcelular de los espectros de las proteínas que disminuyeron su abundancia. C) Análisis de enriquecimiento en base a la localización subcelular de las proteínas que disminuyeron su abundancia. Se obtuvo el promedio de los espectros de las tres replicas biológicas para cada condición, después se calculó el cambio y este fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) ó $t < 0.01$ ().**

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE PROTEÍNAS CUYA ABUNDANCIA AUMENTÓ POR LA SALINIDAD

El análisis de GO para las 21 proteínas que aumentaron su expresión en respuesta a la salinidad (Tabla 9), mostró que más del 80% están involucradas en procesos de transporte y metabolismo de carbohidratos, por un lado generado principalmente por las diversas subunidades de la V-ATPasa y por el otro, por las enzimas glicolíticas (como la enolasa y la G3PDH) y enzimas de la vía CAM (principalmente

la PEPC) (Fig. 18A); esto se puede relacionar con el conteo de espectros asociados a estas proteínas (Fig. 18B), donde el 96% de estos correspondieron a proteínas involucradas en los dos procesos mencionados; mientras que el análisis del enriquecimiento de la función biológica para estas 21 proteínas (Fig. 18C), reveló que a pesar de que los procesos de transporte y metabolismo de carbohidratos estuvieron representados por la mayoría de las proteínas, estos sólo aumentaron al

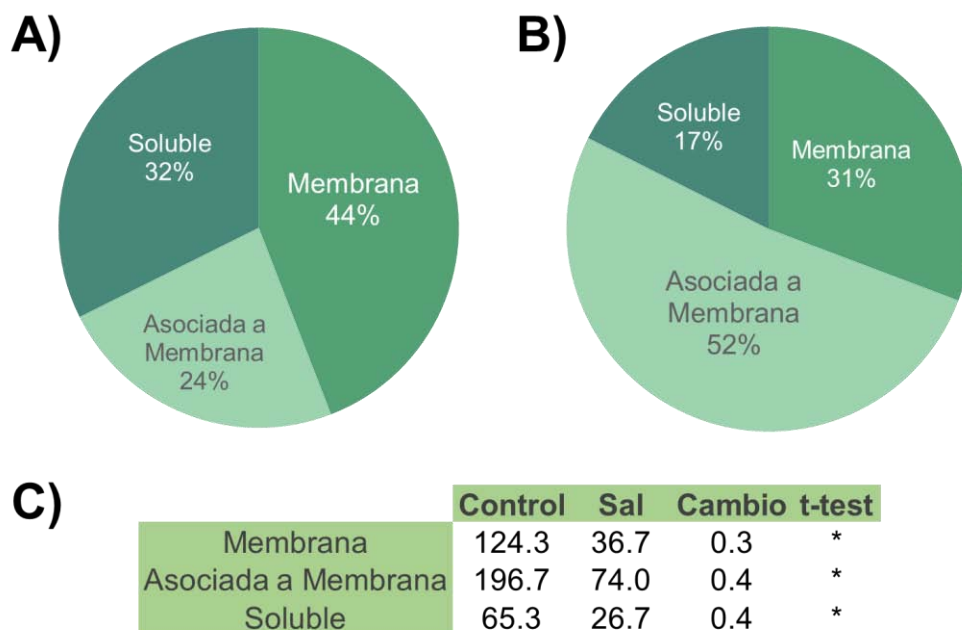


Figura 17. Localización en base a posibles dominios transmembranales de las proteínas cuya abundancia disminuyó por la salinidad y los espectros asociados a estas proteínas. A) Porcentajes de proteínas asociadas a una membrana que disminuyeron su abundancia. B) Porcentaje de espectros de proteínas que disminuyeron su abundancia asociados a una membrana. C) Análisis de enriquecimiento de las proteínas asociadas a una membrana que disminuyeron su abundancia. Se obtuvo el promedio de los espectros de las tres replicas biológicas para cada condición, después se calculó el cambio y este fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) ó $t < 0.01$ ().**

doble en condiciones de salinidad. Por el contrario, las proteínas relacionadas con los procesos de señalización y estrés (entre las que se encuentran aquellas involucradas en el metabolismo del inositol: la inositol 3-fosfato sintasa, la inositol 4-metiltransferasa y la fosfatasa SAC3), aumentaron casi cinco a seis veces, respectivamente, en la condición de salinidad. Estas observaciones indican que pocas proteínas están involucradas en estos dos últimos procesos y no sólo eso,

sino que se encuentran normalmente en baja cantidad, sin embargo, se inducen de manera importante en respuesta a la salinidad.

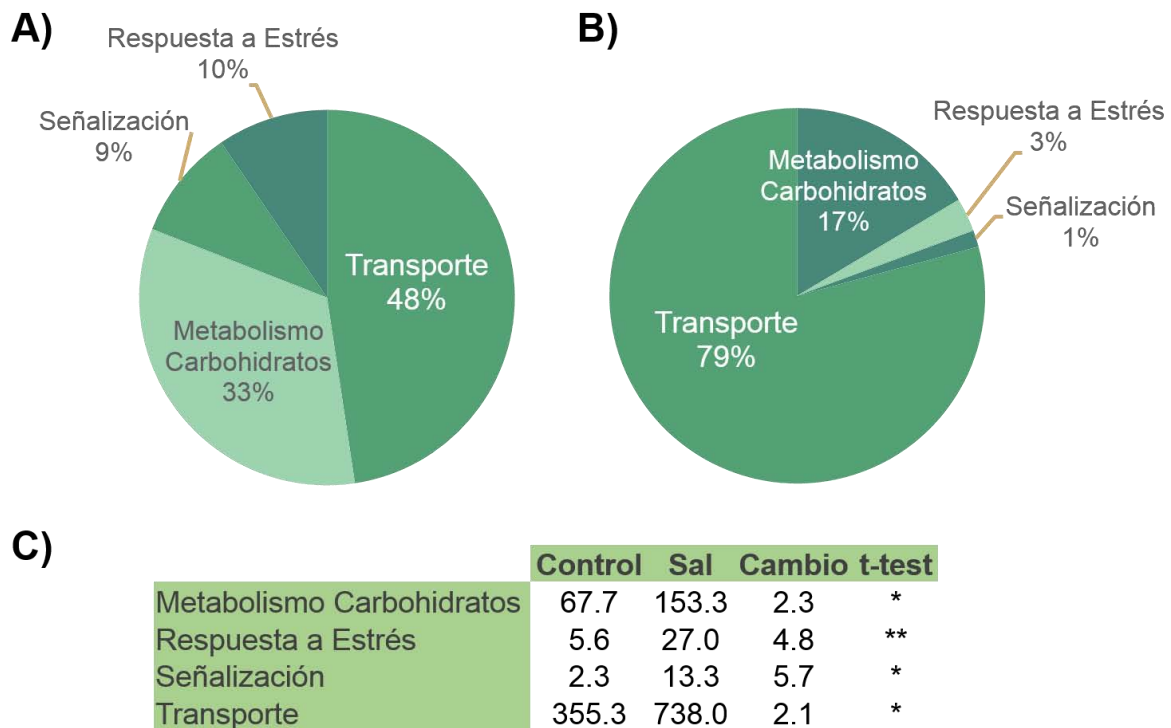


Figura 18. Procesos biológicos en los que participan las proteínas que aumentaron su abundancia en respuesta a la salinidad y los espectros contados de estas proteínas. A) Procesos biológicos en los que participan las proteínas que aumentaron su abundancia. B) Procesos biológicos asociados a los espectros contados de las proteínas que aumentan su abundancia. C) Análisis de enriquecimiento para los procesos biológicos de las proteínas que aumentaron su abundancia. Se obtuvo el promedio de los espectros de las tres replicas biológicas para cada condición, después se calculó el cambio y este fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) ó $t < 0.01$ ().**

El análisis de la localización subcelular de las proteínas que aumentaron su abundancia situó a más del 40% de estas en el citoplasma, mientras que el 33% correspondieron a la vacuola (Fig. 19A). Este hecho reafirma la idea de que algunas proteínas citoplasmáticas estén posiblemente asociadas al tonoplasto. Por el contrario, el conteo de espectros en base a la localización de las proteínas que aumentaron mostró que el 80% de los espectros correspondieron a la vacuola y sólo el 19% al citoplasma (Fig. 19B); estos resultados reflejan que las proteínas del tonoplasto que se inducen por salinidad, se encuentran muy representadas.

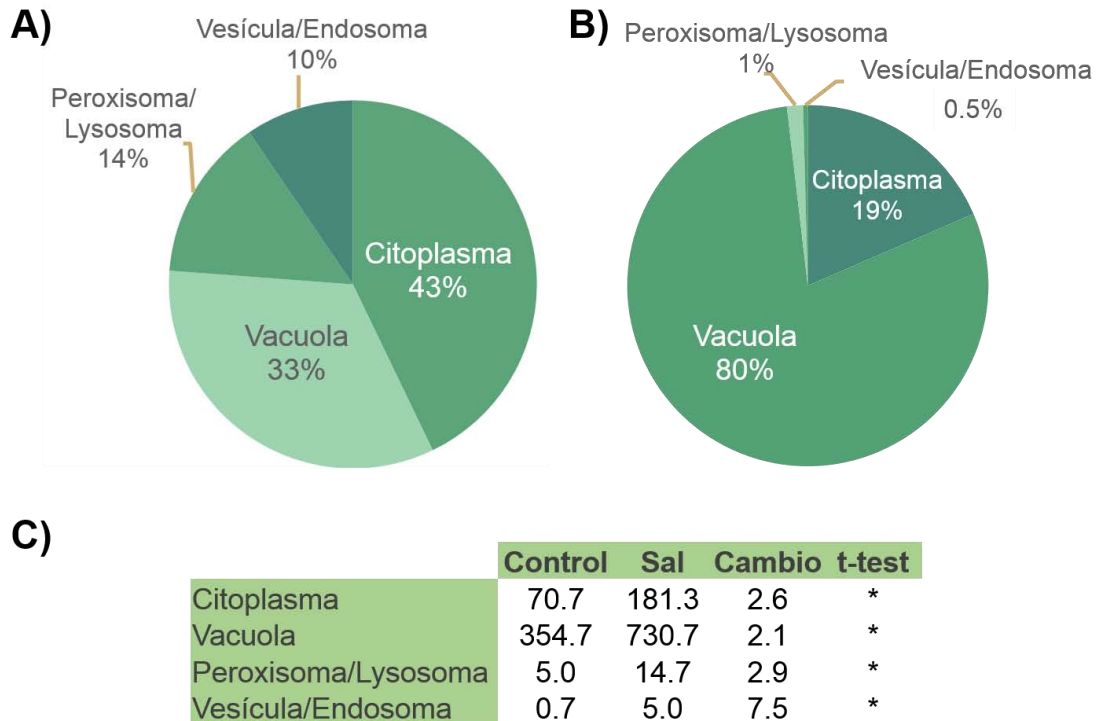


Figura 19. Localización subcelular de las proteínas que aumentaron su abundancia en respuesta a la salinidad y los espectros contados de estas proteínas. A) Localización subcelular de las proteínas que aumentaron su abundancia. **B)** Localización subcelular de los espectros contados para las proteínas que aumentaron su abundancia. **C)** Análisis de enriquecimiento en base a la localización subcelular de las proteínas que aumentan su abundancia. Se obtuvo el promedio de los espectros de las tres replicas biológicas para cada condición, después se calculó el cambio y este fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*).

El análisis de enriquecimiento para la localización celular mostró que las proteínas localizadas en las vesículas y endosomas (principalmente VPS29 y HSP70), fueron de las que más aumentaron en condiciones de salinidad, casi ocho veces, en comparación con las localizadas en citoplasma o vacuola, las cuales sólo se incrementaron al doble (Fig. 19C).

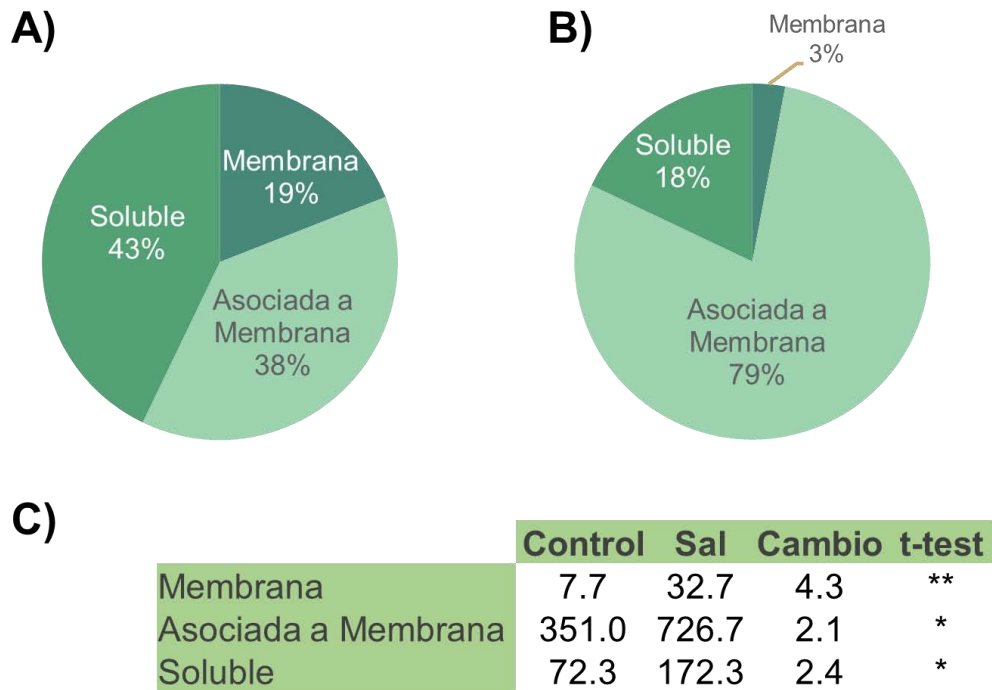


Figura 20. Localización de las proteínas que aumentaron su abundancia con base en posibles dominios transmembranales y los espectros contados para estas proteínas. A) Porcentaje de proteínas que aumentaron su abundancia de acuerdo a su posible localización en una membrana. **B)** Porcentaje de espectros de proteínas que aumentaron su abundancia en base a su posible localización en una membrana **C)** Análisis de enriquecimiento de las proteínas que aumentaron su abundancia en base a su posible localización en una membrana. Se obtuvo el promedio de los espectros de las tres replicas biológicas para cada condición, después se calculó el cambio y este fue considerado confiable tomando un valor de $t < 0.05$ (*) ó $t < 0.01$ (**).

También se analizó la localización en membrana de las proteínas que aumentaron su abundancia, lo que permitió determinar que el 19% de las proteínas que aumentaron fueron integrales de membrana y que la mayoría (43%) de ellas correspondieron a proteínas citoplasmáticas (Fig. 20A). El conteo de espectros de las proteínas que aumentaron su abundancia, mostró que la mayor cantidad de espectros estuvo representado por proteínas asociadas a membrana, grupo donde se clasifican todas las subunidades del dominio V_1 de la V-ATPasa, las cuales se encuentran en gran abundancia (Fig. 20B). El análisis de enriquecimiento (Fig. 20C), mostró que el principal cambio ocurrió en las proteínas integrales de membrana, las cuales aumentaron cuatro veces su abundancia en condiciones de salinidad,

mientras que las proteínas asociadas a una membrana y solubles aumentaron el doble.

Entre las proteínas identificadas en las cuales no se determinó asociación con membranas y que presentaron un incremento en su abundancia (Tabla 9), estuvieron aquellas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, incluyendo algunas enzimas involucradas en la glicólisis, como lo son la fosfoglucomutasa ($\uparrow 2.1$), la triosa fosfato isomerasa ($\uparrow 2.8$), la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa ($\uparrow 5.0$) y la enolasa ($\uparrow 2.0$). Diversos estudios han demostrado que la cantidad de estas proteínas aumenta por la salinidad en un amplio número de especies de plantas (Barkla *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2010; Vera-Estrella *et al.*, 2014). Dentro las proteínas que incrementaron su abundancia y que se consideró están relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, se identificaron la PEP carboxilasa ($\uparrow 2.0$) y la enzima málica ($\uparrow 3.0$), ambas piezas importantes del metabolismo CAM. Estas observaciones concuerdan con reportes anteriores que han demostrado que la abundancia y actividad de estas enzimas aumenta cuando el metabolismo CAM es inducido por el estrés salino (Schmidt *et al.*, 2007) y sirven para confirmar la utilidad del método de conteo de espectros. También se identificaron cambios en la abundancia de la aspartato aminotransferasa ($\uparrow 6.8$), la cual es una enzima clave en el metabolismo de plantas al estar involucrada en las lanzaderas de esqueletos de carbono y nitrógeno intra y extracelularmente (Givan, 1980). Además, cuatro subunidades del dominio periférico de la V-ATPasa registraron cambios significativos en su expresión (Tabla 9), la VHA-B la cual posee el dominio no catalítico de unión al ATP ($\uparrow 2.1$), la VHA-E que forma el tallo central del complejo ($\uparrow 2.3$), la VHA-D involucrada en el ensamblaje del complejo ($\uparrow 2.0$) y la VHA-H, cuya función es regulatoria ($\uparrow 2.0$), coincidiendo con resultados de estudios previos, (Barkla *et al.*, 2009, Vera-Estrella *et al.*, 2014).

Además, se pudieron identificar tres enzimas relacionadas con el metabolismo del inositol que también incrementaron su abundancia (Tabla 9), la inositol-4-

metiltransferasa (↑8.9), la inositol-3-fosfato sintasa (↑12) y la fosfatasa de fosfoinosítidos SAC3 (suppressor of actin 3) (↑2.6).

Cabe destacar la identificación de dos isoformas de la proteína GDAP2 (ganglioside induced differentiation associated protein 2) (Fig. 21a), una que corresponde al mijo (*Setaria italica*) (↑11) y la otra a la del jitomate (*Solanum lycopersicum*) (↑4.4), que aumentaron de manera significativa con respecto al control. El alineamiento de estas dos secuencias determinó que entre ellas poseen un 79% de identidad y al realizar su anotación tomando como referencia SwissProt, no se encontró ningún registro dentro de esta base de datos que diera información clara sobre la función de estas proteínas. La proteína homóloga con la mejor anotación disponible en SwissProt corresponde a una de anémona de mar (*Nematostella vectensis*) y sólo tiene un 54% de identidad con las proteínas identificadas, sin embargo, este registro no posee información precisa sobre la función que está realizando. Al analizar el homólogo de esta proteína en ratón (con un 48% de identidad), se encontró que la proteína se localiza en la membrana del lisosoma e induce la diferenciación de las neuronas (Liu *et al.*, 1999). De manera que resulta complicado asignar una función de esta proteína en relación al estrés por sal.

Cuatro proteínas relacionadas con transporte registraron un incremento (Tabla 9), entre ellas un probable homólogo de MCH1 (↑2.2), el cual aparentemente es un transportador de ácidos monocarboxílicos (Fig. 21b). De acuerdo a SwissProt, la mejor anotación disponible para esta proteína corresponde a un hongo microscópico (*Yarrowia lipolytica*) con sólo un 54% de identidad, mientras que la anotación de GO la localiza en la vacuola. La segunda corresponde a un transportador perteneciente a la familia NRT1/PTR 8.3 (↑2.6). Los miembros de esta familia de transportadores participan en el transporte de di y tripéptidos a través de las membranas (Fig. 21c), sin embargo, algunos miembros de la familia son permeasas de nitrato y otros están involucrados en el transporte de histidina (Tsay *et al.*, 2007). Las otras dos proteínas relacionadas con el transporte celular, son la “vacuolar protein sorting associated protein 29” (VPS29/MAG1 en *Arabidopsis*) (↑8.3), que tiene actividad de fosfatasa de los residuos serina/treonina y es un

componente del retrómero asociado a las membranas (VPS29-VPS26-VPS35-SNX), que es esencial para el transporte vesicular (Oliviusson *et al.*, 2006). La segunda proteína es un homólogo de DnaJ, subfamilia C GRV2 (\uparrow 5.2), también conocida como Hsp40, que forma parte de la maquinaria chaperona DnaK/Hsp70, la cual realiza diversas funciones en la célula, incluyendo el plegamiento de las proteínas nacientes, la translocación de polipéptidos a través de las membranas de los organelos, la coordinación de las respuestas al estrés y la de dirigir al proteosoma proteínas seleccionadas para su degradación (Qiu *et al.*, 2006). Cabe mencionar que durante la anotación se observó que DnaJ interactúa por un lado con VPS29 y por otro, con proteínas del complejo ER-Golgi (Fig. 22).

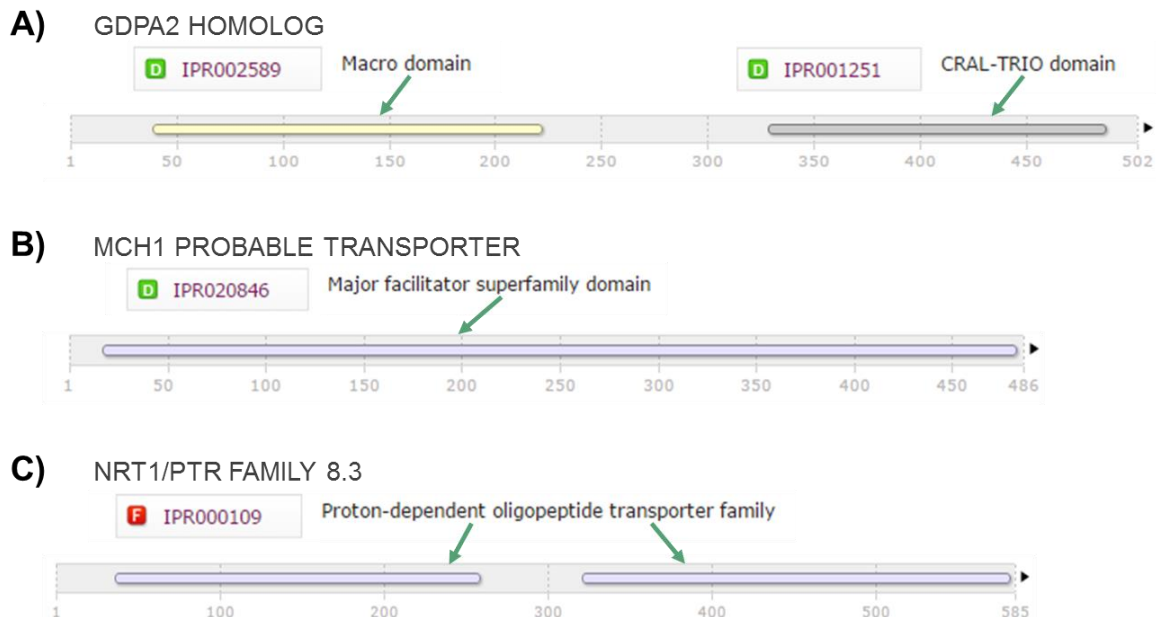


Figura 21. Análisis de dominios de tres proteínas cuya abundancia aumento por la salinidad. La información se obtuvo de la base de datos de dominios de proteínas INTERPROT. **A)** Dominios Macro CRAL-TRIO del homólogo de la proteína GDPA2, la información corresponde a las entrada correspondiente a *Nematostella vectensis*. **B)** El probable transportador de ácidos carboxílicos MCH1 posee el dominio MFS a lo largo de toda su estructura, la información corresponde al registro de *Yarrowia lipolytica*. **C)** Análisis de dominios de la proteína NTR1/PTR 8.3, esta proteína posee el dominio POT característico de esta familia de transportadores.

Finalmente, la enzima (S)-2-hidroxy-ácido oxidasa del peroxisoma, también mostró un incremento en su abundancia (\uparrow 2.3). Esta proteína también se conoce como

glicolato oxidasa y cataliza la oxidación del grupo hidroxilo en posición dos del glicolato para su transformación en glioxilato, lo cual es el segundo paso del ciclo del glioxilato implicado en la fotorespiración. Sin embargo, esta enzima también puede oxidar 2-hidroxy ácidos de cadena corta, mediana y larga (Lindqvist & Braenden, 1989).

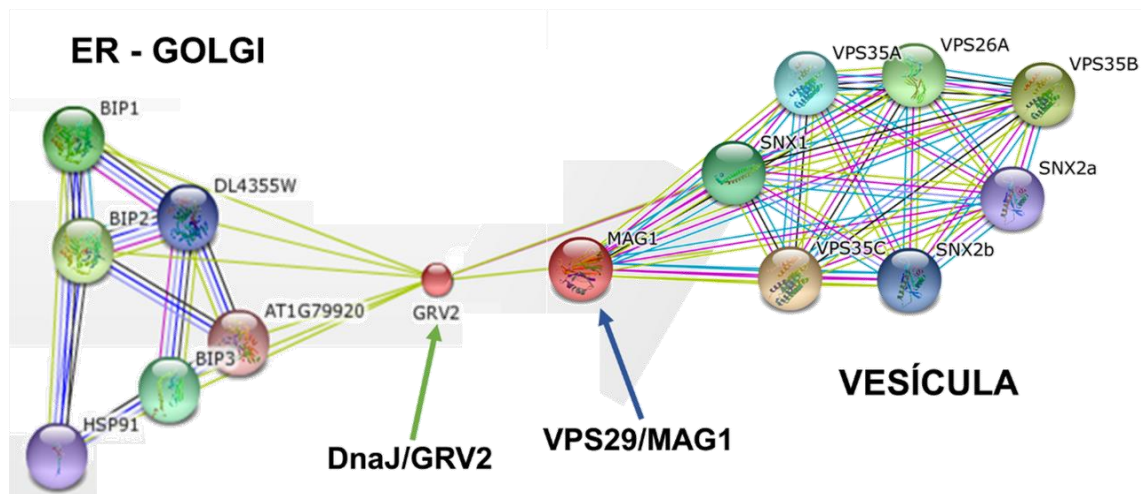


Figura 22. Mapa de interacciones de las proteínas DnaJ y VPS29. En el interactoma de VPS29 y DnaJ, se observa que la red de conexiones se extiende desde grupos proteicos en el complejo ER-Golgi hasta los complejos vesiculares. El mapa fue realizado según la información de la base de datos de interacciones de proteínas String (Szklarczyk et al., 2015).

VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS PROTEÍNAS QUE AUMENTARON SU ABUNDANCIA POR LA SALINIDAD

Con el objetivo de confirmar experimentalmente los resultados del análisis proteómico, se decidió realizar una serie de ensayos tipo Western Blot para algunas proteínas en las cuales se detectó un aumento significativo en su abundancia en condiciones de salinidad. Para esto se emplearon anticuerpos en contra de tres subunidades de la V-ATPasa: VHA-A, VHA-B, VHA-E; dos proteínas del retrómero, VPS29 y VPS35; y contra la PEPC, implicada en el metabolismo CAM. Los ensayos de inmunodetección se cuantificaron con el software libre ImageJ (Schneider *et al.*,

2012), que permite obtener el valor de la intensidad relativa de cada una de las bandas en las imágenes. El análisis de de la V-ATPasa confirmó el aumento inducido por la sal en la abundancia de tres subunidades, la VHA-A (68 kDa) se incrementó 1.9 veces (Fig. 23A), la VHA-B (54 kDa) 3.0 veces (Fig. 23B), mientras que la VHA-E (31 kDa) se incrementó 1.7 veces (Fig. 23C). Aparte, se confirmó la variación en la abundancia de las proteínas del retrómero, observando para VPS29 (21 kDa) un aumentó de 1.5 veces (Fig. 24A), y para VPS35 (92 kDa) un aumento de 1.3 veces (Fig. 24B). También se observó un aumento significativo en la abundancia de la PEPC (110 kDa) de 3.0 veces (Fig. 25). Como se puede observar, todas las proteínas seleccionadas para este análisis aumentaron su abundancia en condiciones salinas, confirmándo los datos obtenidos en el análisis LC-MS/MS.

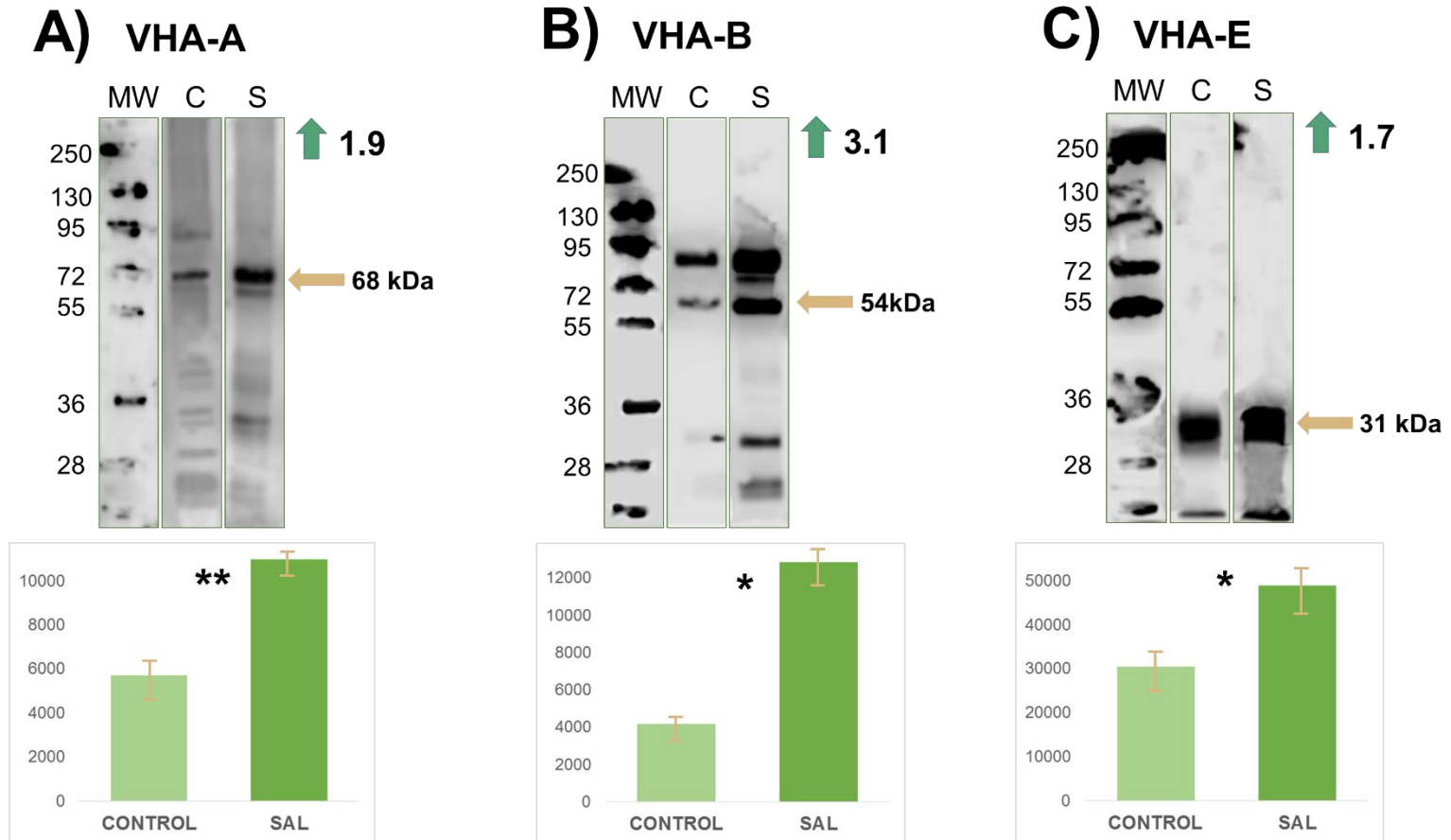


Figura 23. Análisis de la abundancia de tres subunidades de la V-ATPasa por Western Blot. Arriba Se muestran imágenes representativas de los ensayos para las proteínas indicadas; la flecha amarilla indica el peso molecular de cada proteína. **MW**, Marcadores de peso molecular en kDa; **S**, plantas tratadas con 200 mM NaCl; **C**, plantas sin tratar – Control. Debajo de cada imagen de los geles se muestran los histogramas de la intensidad relativa de las bandas correspondiente al promedio de tres replicas biológicas para cada proteína en unidades arbitrarias. El calculo del cambio en la abundancia para cada proteína, el se muestra al lado derecho de los geles acompañado de un flecha verde. Los datos fueron sometidos a la prueba t - student no pareada; (*) $t < 0.05$; (**) $t < 0.01$

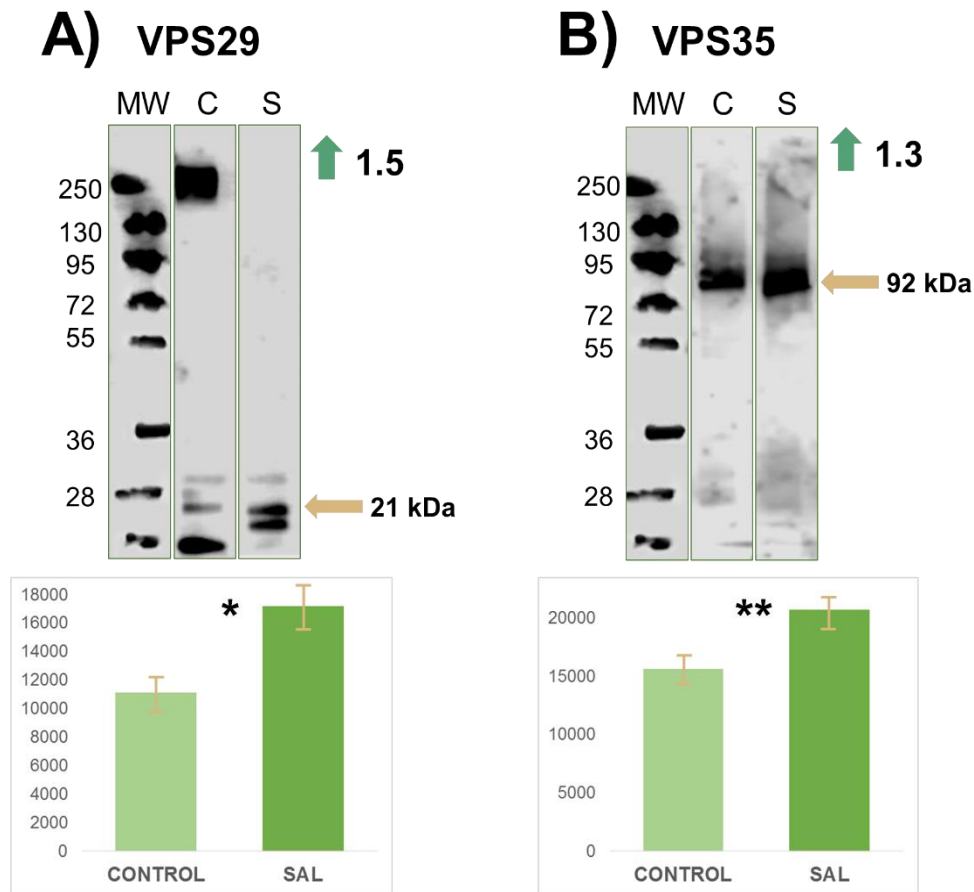


Figura 24. Análisis de la abundancia de dos subunidades del retrómero por Western Blot. Se muestran imágenes representativas de los WB para las proteínas del retrómero indicadas; la flecha amarilla indica el peso molecular de cada proteína. **MW**, Marcadores de peso molecular en kDa; **S**, plantas tratadas con 200 mM NaCl; **C**, plantas sin tratar – Control. Debajo de la imagen de los gels se muestran los histogramas de la intensidad relativa de las bandas correspondiente al promedio de tres replicas biológicas para cada proteína en unidades arbitrarias. El cálculo del cambio en la abundancia, se muestra al lado derecho de cada gel acompañado por un flecha verde. Los datos fueron sometidos a la prueba *t* - student no pareada; (*) $t < 0.05$; (**) $t < 0.01$.

PEPC

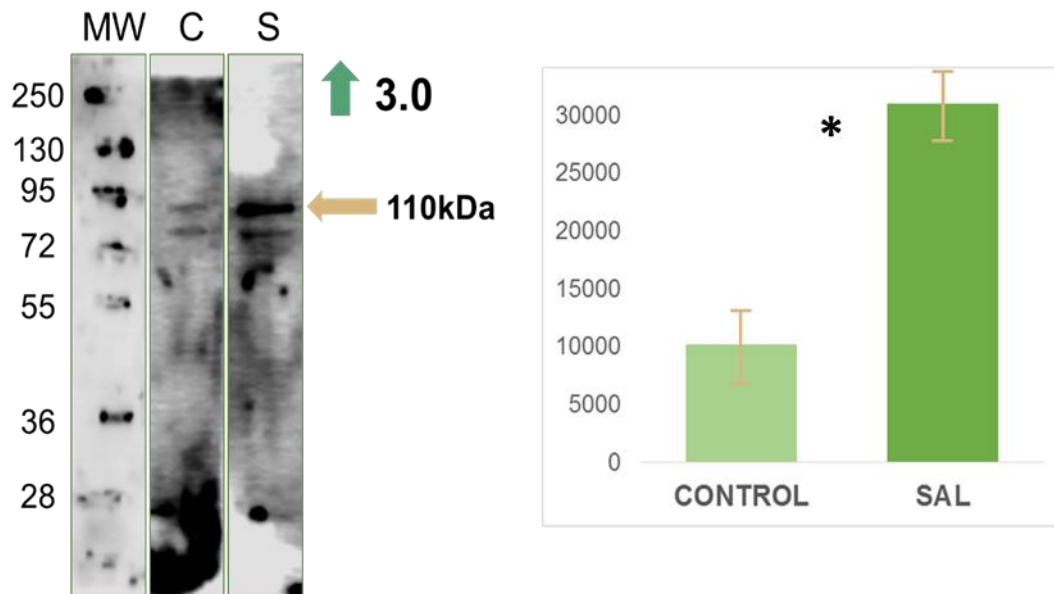


Figura 25. Análisis de la abundancia de la PEPC por Western Blot. Izquierda Se muestra la imagen representativa de las bandas detectadas en el ensayo western blot de la PEPC, la flecha amarilla indica el peso molecular de la proteína. **MW**, Marcadores de peso molecular en kDa; **S**, plantas tratadas con 200 mM NaCl; **C**, plantas sin tratar – Control. A la derecha se muestra el histograma de la intensidad relativa de las bandas correspondiente al promedio de tres replicas biológicas para la proteína en unidades arbitrarias. El calculo del cambio en la abundancia, se muestra a lado derecho del gel acompañado de una flecha verde. Los datos fueron sometidos a la prueba *t* - student no pareada; (*) $t < 0.05$.

CONCENTRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE BAJA ABUNDANCIA EN MEMBRANAS MICROSOMALES Y DEL TONOPLASTO DE *M. crystallinum*

Un problema frecuentemente asociado a un análisis proteómico de cualquier muestra, independientemente de su nivel de fraccionamiento, es la alta abundancia de algunas proteínas. Esto limita y complica la detección de proteínas menos abundantes. En las hojas de las plantas, un ejemplo de una proteína muy abundante es la enzima RUBISCO, que representa hasta 40% de la proteína total (Stitt *et al.*, 2010). Una situación similar se presenta con el endospermo de la semilla, donde diferentes proteínas de almacenamiento están presentes en grandes cantidades (Shewry *et al.*, 1995).

Diversos estudios han demostrado que el empleo de bibliotecas combinatorias de hexapéptidos (CPLL) permite hacer frente a esta limitación, facilitando la detección de las proteínas de baja abundancia en la muestra (Boschetti & Righetti, 2008a). Esta herramienta se ha aplicado para la búsqueda de proteínas que se encuentran en baja abundancia en diversos fluidos biológicos animales, tales como la orina y suero sanguíneo (Boschetti & Righetti, 2008b) y algunos extractos vegetales con alto contenido proteico como la leche de coco (Fasoli *et al.*, 2011). Ciertamente el uso de esta estrategia en plantas es aún muy limitado, entre otras cosas porque la técnica requiere muestras con altas concentraciones de proteína, un hecho difícil de lograr en muestras vegetales. Además, los tejidos vegetales son ricos en proteasas y enzimas oxidativas y contienen en gran cantidad compuestos fenólicos, almidones, aceites, pigmentos y metabolitos secundarios, que contaminan los extractos de proteínas. Todos estos “contaminantes” interfieren en la interacción de las proteínas con las esferas CPLL, impidiendo la captura y la posterior detección e identificación de especies de baja abundancia (Frölich *et al.*, 2012). A pesar de esto, Frölich *et al.* (2012) han propuesto una modificación al protocolo original diseñado para suero sanguíneo, la cual ha mostrado mejorar los resultados de la técnica para extractos vegetales, permitiendo una mayor identificación de proteínas. La modificación consiste en usar una solución caliente de SDS–DTT (4% SDS, 50 mM DTT, 95°C) como agente de elución, en lugar del buffer que provee el fabricante a base de urea/CHAPS (8 M urea, 2% CHAPS). El protocolo modificado se aplicó en extractos de hoja y floema de *Arabidopsis* y resultó en el incremento del número de proteínas identificadas desde 79% hasta un 124%, de las cuales un gran número se describieron por primera vez (Frölich *et al.*, 2012).

No existen reportes de que esta técnica haya sido usada en muestras de *M. crystallinum*, por lo que antes de continuar con un análisis más detallado de las fracciones del tonoplasto aisladas mediante FFZE fue necesario validar que la técnica funcionara con muestras de esta planta. Para esto se decidió aplicar el tratamiento CPLL a extractos microsomales crudos de hojas de *M. crystallinum* L. siguiendo el protocolo planteado por Frölich *et al.*

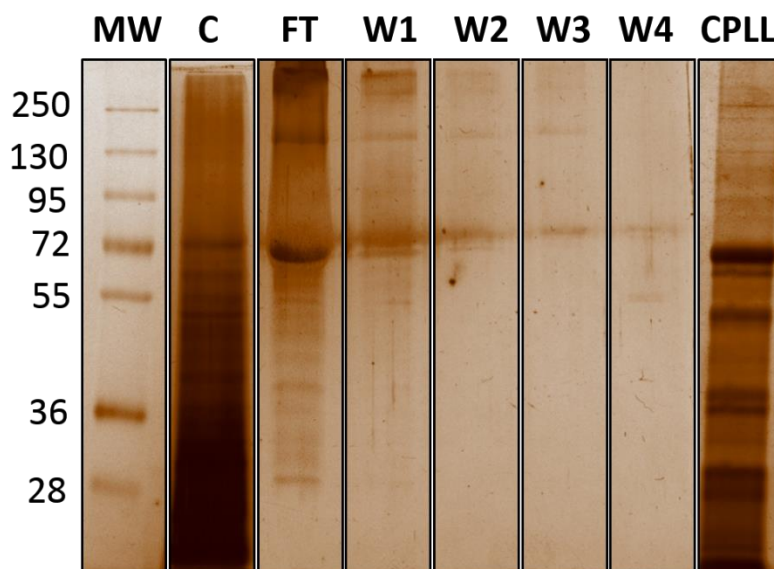


Figura 26. Tratamiento de extracto crudo de microsomas de hojas de plantas tratadas con 200 mM NaCl con CPLL. Un ml de muestra conteniendo 4 mg de proteína se incubó en una columna CPLL, después de cuatro etapas de lavado (**W1 a W4**), las proteínas se eluyeron de la columna usando una mezcla caliente de SDS–DTT. Alícuotas de las diferentes fracciones CPLL colectadas, se separaron mediante SDS-PAGE y las proteínas fueron teñidas con plata. **C**, Fracción extracto microsomal crudo; **CPLL**, Fracción eludida; **FT**, Fracción de equilibrio; **MW**, Marcadores de peso molecular en kDa.

En la Figura 26 se puede observar que la cantidad inicial de proteína en la fracción cruda fue alta y consistió de un gran número de proteínas con abundancia variable (Fig. 26, carril C). En la fracción de equilibrio y de los lavados posteriores, se observó la eliminación de algunas proteínas, en particular aquellas con un peso molecular entre aproximadamente 250 kDa y 72 kDa. Con cada etapa de lavado subsecuente, la cantidad de proteína disminuyó (Fig. 26, carriles W1 a W4). En la fracción CPLL se apreció el enriquecimiento de algunas proteínas en comparación al extracto crudo (Fig. 26, carril CPLL). Se puede observar que el perfil de proteínas de la fracción CPLL fue diferente al de la fracción microsomal total, lo cual indicó que las proteínas correspondientes a la fracción CPLL se enriquecieron a partir de la fracción cruda. Con el fin de confirmar la disminución de las proteínas de alta abundancia y el enriquecimiento de las proteínas de baja abundancia por el uso de la columna de CPLL, se realizaron ensayos Western Blot contra la subunidad grande de la RUBISCO (55 kDa), que representa una proteína de alta abundancia en membranas microsomales y contra de la subunidad E de la V-ATPasa (31 kDa),

que representando una proteína de baja abundancia en membranas microsomales. Este análisis por Western Blot reveló que la subunidad grande de la RUBISCO (Fig. 27A), que muestra una alta abundancia en la fracción cruda, disminuyó gradualmente a lo largo del proceso de lavado que culmina en una menor abundancia en la fracción eludida. En contraste, la proteína VHA-E (Fig. 27B), apenas fue detectable en el extracto crudo mientras que en la fracción eludida su abundancia aumentó considerablemente. La proteína VHA-E no se detectó ni en la fracción de equilibrio ni en las fracciones de lavado, indicando que la concentración de esta proteína de baja abundancia se enriqueció solamente en la fracción eludida. Estos resultados confirmaron que esta metodología fue efectiva para la disminución de la concentración de proteínas abundantes y el consecuente enriquecimiento de proteínas de baja abundancia en microsomas de *M. crystallinum*.

Por otra parte, el conteo de espectros de los datos obtenidos del análisis LC-MS/MS de fracciones enriquecidas en tonoplasto de plantas tratadas con 200 mM NaCl que se obtuvieron a través de FFZE, permitió determinar las proteínas que se encuentran de manera muy abundante en las fracciones (Tabla 10). En estas fracciones se encontró que el complejo proteico que forma el dominio periférico (V_1) de la V-ATPasa fue extremadamente abundante, ya que siete de las ocho subunidades que lo conforman representaron casi el 33% de la proteína total en la muestra. Las subunidades VHA-A y VHA-B fueron especialmente abundantes, contribuyendo con alrededor del 23% de la proteína total. Otras proteínas identificadas con alta abundancia fueron las enzimas glicolíticas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y enolasa, así como la pirofosfatasa vacuolar y la PEP carboxilasa, todo esto indica que sólo 11 proteínas constituyeron casi el 40% de la proteína total presente en las fracciones.

Tabla 10. Número de espectros LC-MS/MS de proteínas abundantes en fracciones enriquecidas en tonoplasto de hojas de *M. crystallinum* tratadas con sal.

| | Numero de Espectros | Porcentaje del Total |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|
| Subunidades de la V-ATPasa | | |
| VHA-B | 2173 | 12.0% |
| VHA-A | 1938 | 10.7% |
| VHA-E | 694 | 3.8% |
| VHA-D | 209 | 1.2% |
| VHA-d | 425 | 2.3% |
| VHA-C | 192 | 1.1% |
| VHA-H | 315 | 1.7% |
| Total V-ATPasa | 5946 | 32.8% |
| Enzimas Glicolíticas | | |
| G3PDH | 185 | 1.0% |
| Enolasa | 149 | 0.8% |
| Total E. Glicolíticas | 334 | 1.8% |
| Otras Proteínas | | |
| VPPasa | 402 | 2.2% |
| PEP Carboxilasa | 351 | 1.9% |
| Total Otras Proteínas | 753 | 4.1% |
| TOTAL | 7033 | 38.7% |

Se cuantificó la cantidad de espectros de cada proteína en las tres replicas biológicas y posteriormente fue comparada con el total de espectros. Sólo once proteínas representan casi el 40% de un total de 18,166 espectros contados en las muestras.

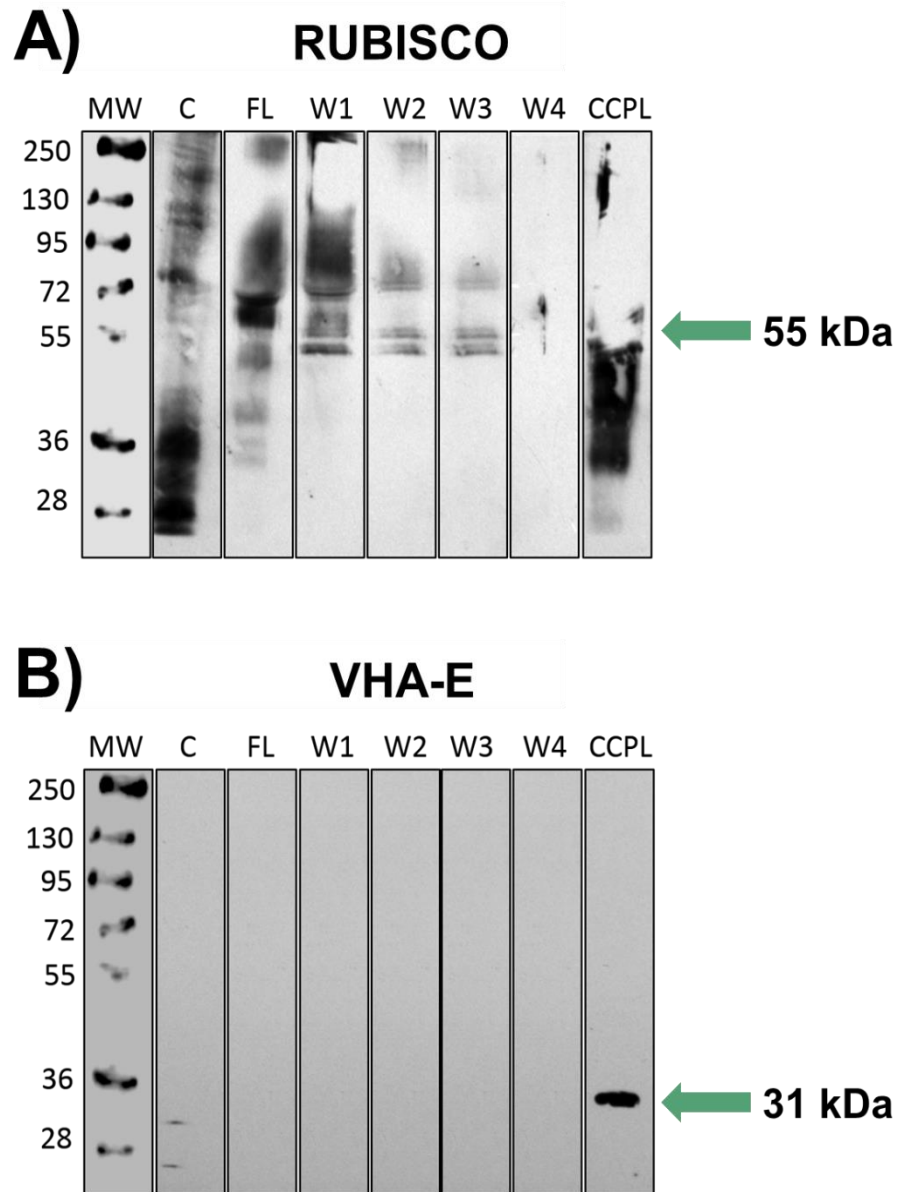


Figura 27. Análisis de las fracciones colectadas de la columna CPLL por Western Blot. Las proteínas en las diferentes fracciones aisladas de la columna de CPLL fueron separadas por SDS-PAGE y se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF para el análisis de Western Blot. Los blots se incubaron con un anticuerpo contra la RUBISCO, representando una proteína de alta abundancia (A) o la subunidad E de la V-ATPasa de baja abundancia (B). **C**, Fracción Extracto Crudo; **CPLL**, Fracción eluida; **FT**, Fracción de equilibrio; **W1 a W4**, Fracciones de lavado

Con base en estos resultados y con el objetivo de reducir la concentración de las proteínas muy abundantes en las muestras, para así enriquecer las proteínas menos abundantes, se aplicó el tratamiento con CPLL a fracciones enriquecidas en tonoplasto aisladas mediante FFZE.

El perfil de separación 1D-SDS-PAGE de las fracciones tratadas con CPLL, mostró el enriquecimiento de algunas proteínas entre 72 y 40 kDa (Fig. 28; CPLL flechas verdes) en comparación al extracto crudo y la fracción de equilibrio (Fig. 28; TP y FL). También se observó el enriquecimiento de un grupo de proteínas entre 40 y 28 kDa en la fracción CPPL, que no se observaron en las fracciones TP y FL (Fig. 28; flecha azul). Además, se observó una serie de bandas de bajo peso molecular (<26 kDa) que solamente se aislaron en la fracción de equilibrio (Fig. 28; flecha roja), esto sugiere que la captura de proteínas de bajo peso molecular por parte de la biblioteca CPLL no resultó muy eficiente.

Para validar el enriquecimiento o la disminución de las proteínas de baja y alta abundancia, respectivamente por el tratamiento con la CPLL, se realizaron ensayos de Western Blot. Para las inmunodetecciones, se emplearon anticuerpos contra las subunidades VHA-A (68 kDa) y la VHA-B (54 kDa) de la V-ATPasa, que representan proteínas de muy alta abundancia del tonoplasto, así como un anticuerpo contra de la VHA-E (31 kDa) ,que representa una proteína de mediana abundancia en el tonoplasto. En estos ensayos, las proteínas de alta abundancia VHA-A y VHA-B se detectaron en todas las fracciones (Fig. 29A-B). La subunidad VHA-E, también se detectaron en todas las fracciones (Fig. 29C), sin embargo, a diferencia del ensayo anterior, la señal en la fracción de equilibrio fue muy baja, posiblemente debido a que la cantidad de VHA-E que no capturó la biblioteca fue muy baja, lo que causó su mayor concentración en la fracción CPLL, donde se aprecia una señal de alta intensidad (Fig. 29C).

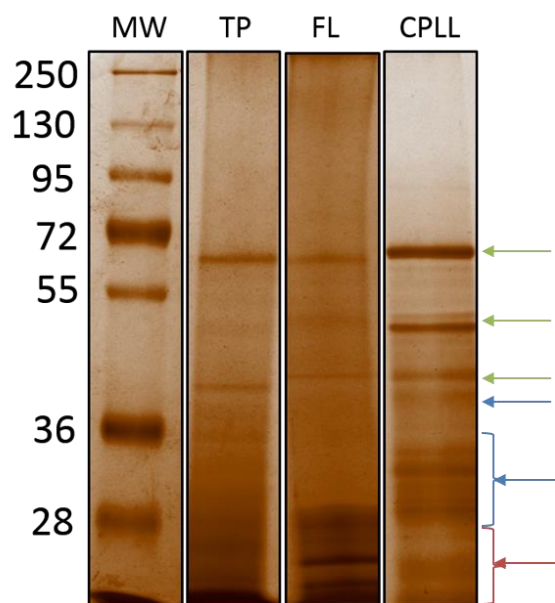


Figura 28. Tratamiento con CPLL de fracciones puras de tonoplasto de hojas de plantas de *M. crystallinum* tratadas con 200 mM NaCl. Una muestra de tonoplasto (1 ml) conteniendo 350 μ g de proteína total se incubó en una columna CPLL. Las proteínas se eluyeron de la columna usando 4% SDS, 50 mM DTT a 95°C. Alícuotas de las diferentes fracciones colectadas de la columna CPLL se separaron mediante 1D-SDS-PAGE y las proteínas en el gel se tiñeron con plata; **MW**, Marcadores de peso molecular en kDa; **TP**, Fracción Cruda de Tonoplasto; **FL**, Fracción de equilibrio; **CPLL**, Fracción eludida

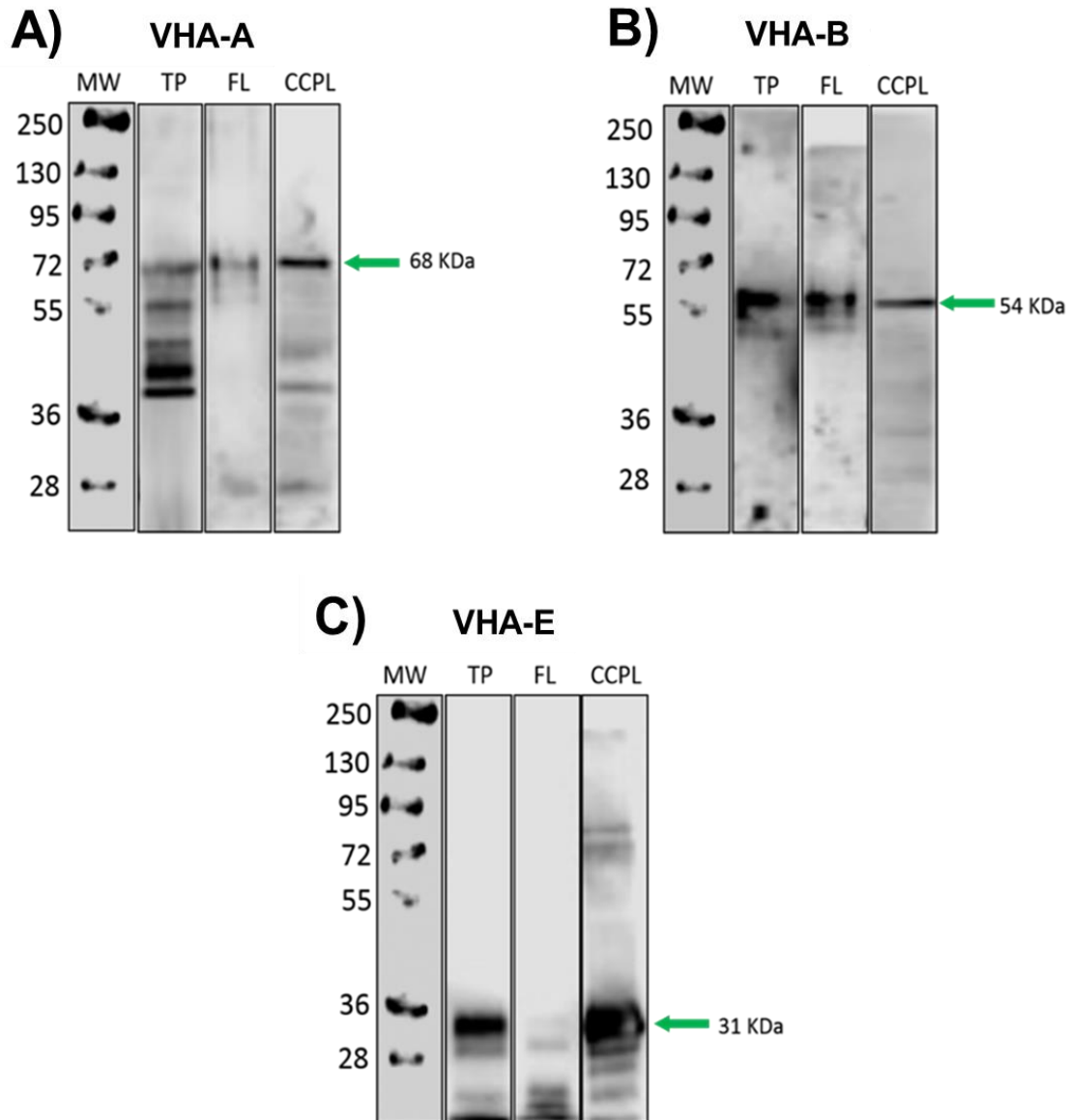


Figura 29. Análisis Western Blot de las fracciones de tonoplasto colectados de la columna CPLL. Los blots fueron incubados con un anticuerpo que reconoce la subunidad A de la V-ATPasa (**A**), la subunidad B de la V-ATPasa (**B**) o la subunidad E de la V-ATPasa (**C**), representando proteínas del tonoplasto de alta (VHA-A y VHA-B) y mediana abundancia (VHA-E); **MW**, Marcadores de peso molecular en kDa; **TP**, Fracción Cruda; **FL**, Fracción de equilibrio; **CPLL**, Fracción eludida; las flechas muestran el peso molecular de cada proteína

Estos resultados confirmaron la disminución de la concentración de las proteínas abundantes y el enriquecimiento de las especies no abundantes en fracciones de

tonoplasto de *M. crystallinum* tratadas con la biblioteca CPLL. De tal manera, se continuó con el estudio para la detección de especies de baja abundancia en el análisis MS/MS, esperando encontrar proteínas que pudieran tener un papel importante en mecanismos involucrados en la tolerancia a la salinidad.

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE FRACCIONES CPLL DEL TONOPLASTO DE *M. crystallinum*

En el análisis de las fracciones CPLL, la identificación y anotación de las proteínas se realizaron de la misma manera y con los mismos criterios que en la fracción cruda. En este caso se identificaron 603 diferentes proteínas de tres réplicas biológicas de cada una de las condiciones experimentales. De éstas, con una buena confiabilidad (con dos péptidos únicos en dos de las tres replicas biológicas analizadas) se identificaron 357 proteínas (59%), de las cuales 281 proteínas fueron reprimidas en condiciones de salinidad y 76 proteínas inducidas con la salinidad (Fig. 30).

Las asignaciones funcionales GO, así como la localización subcelular de las 603 proteínas identificadas en las fracciones CPLL se muestran en la Figura 31. Se puede observar que la distribución en cuanto a función biológica (Fig. 31A), los procesos de respuesta a estrés (23%), desarrollo y crecimiento (10%), metabolismo de proteínas (10%), catabolismo (10%) y transporte (9%), representaron el mayor número de proteínas identificadas. Por otro lado, la localización subcelular para las proteínas de las fracciones CPLL (Fig. 31B), mostró que proteínas del citoplasma (35%), cloroplasto (20%) y vacuola (11%) estuvieron más representadas. Estas dos distribuciones son muy similares a la de las proteínas identificadas en la fracción sin el tratamiento CPLL (Fig. 31A-B). Por otra parte, al agrupar estas proteínas en base a su posible localización en alguna membrana (Fig. 31C), se pudo observar que casi la mitad de estas se identificaron como Asociadas a Membrana, mientras que sólo una cuarta parte se identificaron como proteínas integrales de membrana.

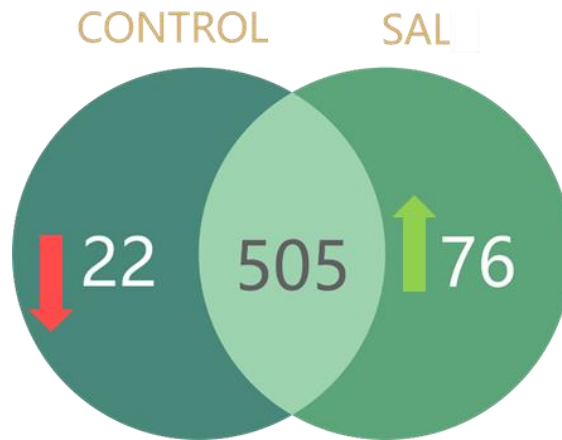


Figura 30. Distribución de las proteínas aisladas con la biblioteca CPLL e identificadas por LC-MS/MS para cada condición experimental. Se lograron identificar un total de 603 proteínas, 22 de ellas fueron reprimidas y 76 fueron inducidas por salinidad.

Las proteínas capturadas por la columna de CPLL estuvieron representadas por dos tipos de proteínas, por un lado, las denominadas de alta abundancia, las cuales saturan a su ligando en la columna y por otro, aquellas denominadas de baja abundancia, las cuales no saturan a su ligando. En esta fracción fue posible detectar 506 proteínas (Fig. 32, 412+94) que representan un 84% del total, lo que indica que no todas las proteínas son capaces de unirse a la biblioteca CPLL. Del total de proteínas capturadas por la columna, 94 se detectaron exclusivamente en la fracción CPLL, que representan únicamente aquellas que se encuentran en baja abundancia, el hecho de no ser detectadas en la otra fracción indica que no saturaron su ligando. El resto de las proteínas (412) representan aquellas abundantes que sí saturaron su ligando en la columna CPLL, por lo tanto, también se identificaron en el flowthrough.

Entre las 94 proteínas de baja abundancia identificadas, es de destacar la inducción de 67 proteínas en condiciones de salinidad (Fig. 32). Dentro de este subconjunto se identificaron un gran número de proteínas de almacenamiento (Tabla 11A) y de

proteínas involucradas en defensa, las cuales se localizan en la pared celular, por lo que se denominan membranotoxinas (Tabla 11B).

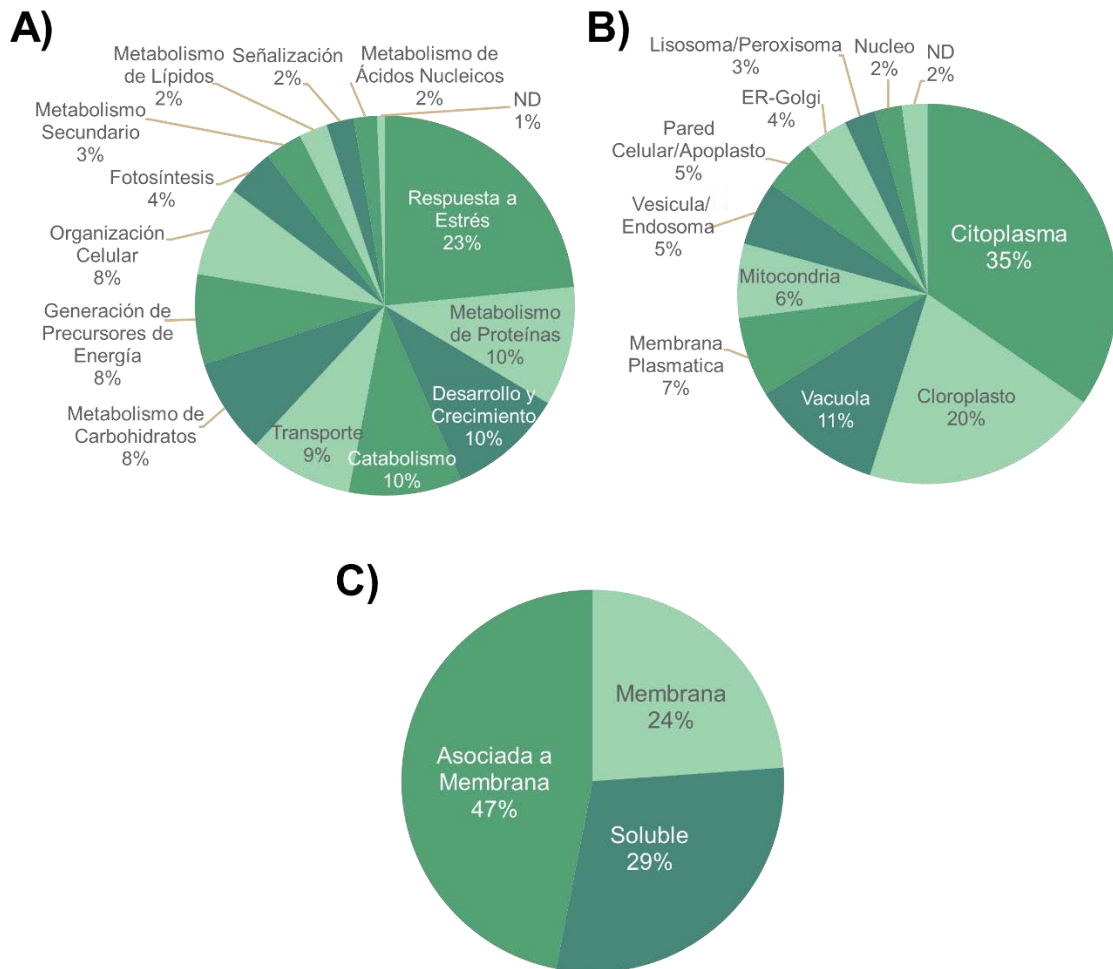


Figura 31. Procesos biológicos y localización de las proteínas identificadas en las fracciones CPLL. A) Procesos biológicos B) Localización subcelular. C) Clasificación de acuerdo a la presencia o ausencia de dominios transmembranales.

También se identificaron dos proteínas implicadas en el transporte vesicular, un homólogo de la proteína Sec24, la cual forma parte de la envoltura de las vesículas del sistema de transporte COPII; y una flipasa no específica de lípidos del tipo 2G, la cual ayuda a la formación de los complejos vesiculares; finalmente la acuaporina TIP3;1 también se identificó como proteína de baja abundancia inducida por la salinidad.

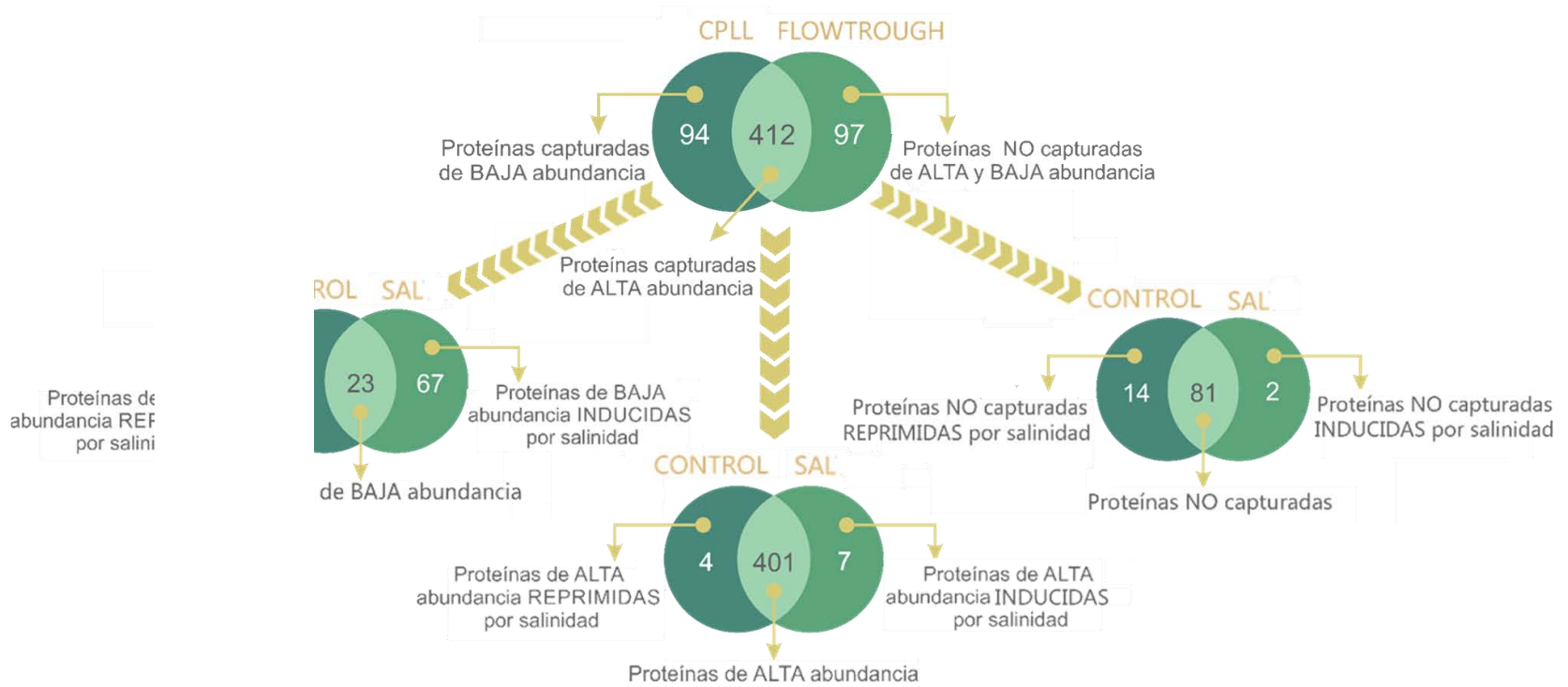
En la fracción FT se detectaron 509 proteínas (85% del total) (Fig. 32; 412+97), de las cuales, 97 fueron identificadas exclusivamente en esta fracción las cuales representan aquellas proteínas no capturadas por la columna (Fig. 32C), estas proteínas pueden ser tanto abundantes como no abundantes, ya que el hecho de no haber sido capturadas puede deberse a que posiblemente no tienen un ligando en la biblioteca CPLL o a que sus propiedades fisicoquímicas impidieron la interacción con la biblioteca, por lo tanto, su captura. Dentro de este grupo de proteínas no capturadas, fue posible detectar algunas involucradas en el transporte vesicular, entre las que destaca un homólogo de la proteína DnaJ subfamilia C GRV2, la cual también se detectó como una proteína con un cambio de expresión significativo en análisis proteómico de la fracción cruda. Además, se identificó un homólogo de la proteína VAC14, la cual está involucrada en regular tanto la síntesis como la interconversión de fosfatidilinositol 3,5-bifosfato, esto se puede relacionar con el hecho de que dos enzimas implicadas en el metabolismo de este compuesto (la inositol-3-fosfato sintasa y la fosfatasa de inosítidos SAC3), también se encuentran sobre expresadas en condiciones de salinidad en la fracción cruda. Otras proteínas que se pudieron identificar fueron la proteína 711 asociada a vesículas y la syntaxina 22, ambas participan en el ensamblaje y focalización de los complejos vesiculares. También, se observó que 49 de las 97 proteínas exclusivas de la fracción FT (51%), se identificaron como integrales de membrana (Fig. 33A); entre éstas se encuentran seis transportadores ABC (C1, C4, C7, C8, C9 y G7), subunidades del fotosistema I (subunidad XI) y fotosistema II (citocromo b6f, citocromo 559 y la subunidad de 22 kDa), la acuaporina PIP1:2, la subunidad c4 del dominio V_0 de la V-ATPasa, así como transportadores de azúcares (triosa y xilosa) y Mg^{+2} . Esta observación es de gran importancia, ya que estas 49 proteínas de membrana representan el 35% del total de la proteínas de membrana identificadas en ambas fracciones CPLL (Fig. 33B). Estos datos muestran que la biblioteca CPLL no es muy efectiva en la captura de proteínas integrales de membrana. Al cuantificar el número de dominios transmembranales de estas 49 proteínas (Fig. 33C), se observa que la tercera parte posee sólo un dominio transmembranal (calnexina, nicalina, syntaxina), aproximadamente la cuarta parte posee dos dominios

transmembranales (subunidad 22 kDa del fotosistema II y el transportador de Mg²⁺, MRS2-1) y otra tercera parte posee más de diez dominios transmembranales (transportadores ABC y de azúcares).

Tabla 11. Proteínas de almacenamiento y de defensa identificadas en la fracción CPLL.

| A) PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO | | B) PROTEÍNAS DE DEFENSA | |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---|
| UNIPROT ACC. | NOMBRE | UNIPROT ACC. | NOMBRE |
| P12615 | 12S globulina | P01085 | Alfa-amilasa inhibidor 0.19 |
| P29835 | 19 kDa globulina | P01083 | Alfa-amilasa inhibidor 0.28 |
| P04724 | Alfa/beta-gliadina A-IV | P16850 | Alfa-amilasa/tripsina inhibidor CM1 |
| Q2A784 | Avenina a1 | P16159 | Alfa-amilasa/tripsina inhibidor CM16 |
| P0CZ07 | Avenina a2 | P17314 | Alfa-amilasa/tripsina inhibidor CM3 |
| P0CZ06 | Avenina b3 | Q9FRV0 | Endoquitinasa C |
| A7XUQ5 | Avenina b5 | P82993 | Beta-amilasa |
| P08453 | Gama-gliadina | P83207 | Quimiotripsina inhibidor WCI |
| P21292 | Gama-gliadina | Q9M4E3 | Hordoindolina-A |
| P04730 | Gama-gliadina A | Q10464 | Puroindolina-B |
| P06659 | Gama-gliadina B | P93693 | Serpina-Z1B |
| P15590 | Globulina 1S | Q43492 | Serpina-Z7 |
| P10388 | Glutenina subunidad DX5 | Q43723 | Tripsina/alfa-amilasa inhibidor CMX1/CMX3 |
| P10387 | Glutenina subunidad DY10 | Q05806 | Thionina |
| P10385 | Glutenina subunidad pequeña | | |
| P09799 | Vicilina GC72-A | | |

Estas proteínas se detectaron como de baja abundancia, además, ellas se indujeron en condiciones de salinidad, ya que sólo se detectaron en las fracciones tratadas con NaCl.



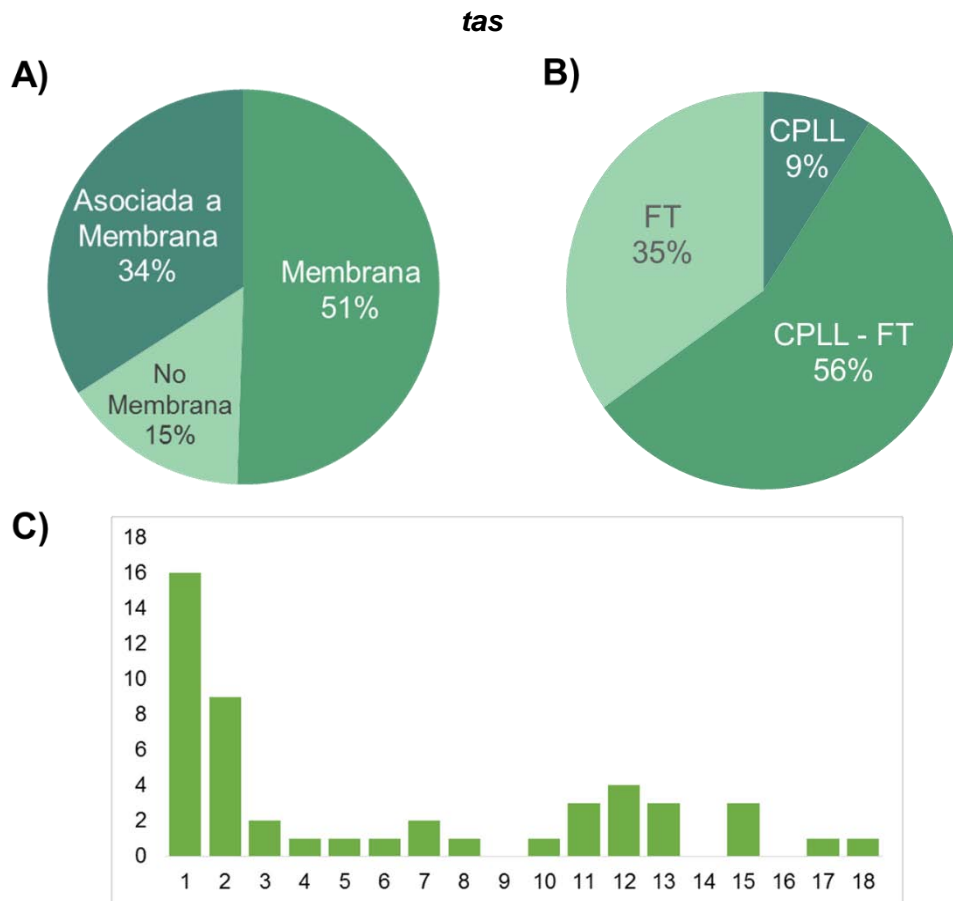


Figura 33. *Distribución de las 47 proteínas exclusivas de la fracción FT.A) Distribución en base a su posible localización en alguna membrana. B) Distribución de todas las proteínas integrales de membrana identificadas en ambas fracciones CPLL. C) Número total de dominios transmembranales de estas proteínas.T.*

PROTEÓMICA COMPARATIVA ENTRE LA FRACCIÓN CRUDA ENRIQUECIDA EN TONOPLASTO Y LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN EL TRATAMIENTO CPLL

A través de un análisis comparativo de las fracciones crudas y de CPLL, fue posible identificar un total de 855 proteínas únicas (Fig. 34), de las cuales 252 fueron identificadas exclusivamente en la fracción cruda, es decir, corresponden a proteínas que se pierden durante el tratamiento CPLL, y representa el 47% de las 530 proteínas identificadas originalmente en la fracción cruda. Por su parte, en el tratamiento CPLL fueron detectadas 325 del total de 855 proteínas únicas. Esta cifra indica que con el tratamiento CPLL fue posible identificar 54% más de proteínas,

aparte de las 530 que inicialmente se habían identificado. Este resultado era de esperarse ya que el tratamiento CPLL divide la muestra en varias fracciones, reduciendo su complejidad y permitiendo la detección de más proteínas. Por ejemplo, gracias a esta técnica fue posible identificar proteínas implicadas en transporte que inicialmente no se habían detectado, como el “vacuolar-sorting receptor 1”, encargado de organizar algunos cargos que se transportan a la vacuola; la enzima 1-fosfatidil inositol fosfodiesterasa, implicada en el metabolismo de los fosfoinosítidos y la proteína RABC2a, que es señalizador del transporte intravesicular. También fue posible identificar proteínas presentes en poca abundancia, que inicialmente no se habían detectado, tal es el caso de las proteínas de almacenamiento y de defensa previamente descritas.

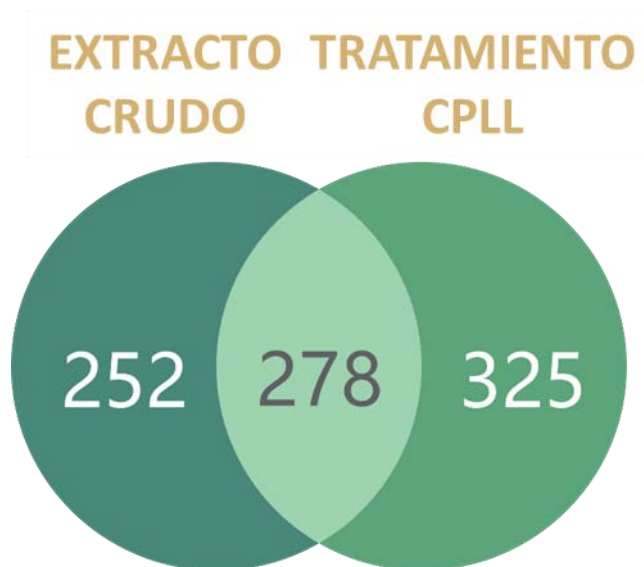


Figura 34. Distribución de las proteínas identificadas en la fracción cruda enriquecida en tonoplasto y las proteínas aisladas con la CPLL. Se muestra la distribución de las 855 proteínas únicas identificadas por LC-MS/MS. 325 (54%) de estas proteínas solamente pudieron ser identificadas mediante el uso de la biblioteca CPLL.

DISCUSIÓN

La identificación de diez de las once enzimas glicolíticas en fracciones enriquecidas en tonoplasto, tanto en muestras control como tratadas con sal, es un hecho relevante y lleva a pensar que este complejo de enzimas se encuentra de alguna manera asociado al tonoplasto, independientemente de la condición en que se encuentre la planta. Lo anterior se ha reportado en estudios previos, en los cuales también se han detectado proteínas implicadas en la glicólisis en fracciones aisladas de diferentes tipos de membranas, en organismos que van desde los mamíferos hasta las plantas. Por ejemplo, un estudio de proteómica mitocondrial en *Arabidopsis* detectó la presencia de siete enzimas glicolíticas asociadas a la membrana mitocondrial externa (Ferne *et al.*, 2003). Lo anterior lleva a replantear la visión clásica que se tiene sobre las enzimas glicolíticas, donde se pensaba que estas difunden libremente por todo el citoplasma; actualmente se argumenta que los complejos glicolíticos pueden concentrarse alrededor de organelos o regiones de membrana, como lo son el tonoplasto y el complejo ER-Golgi, donde se requiere una alta demanda de piruvato y precursores del ATP como lo es el NADH⁺, formando complejas redes energéticas que generan y canalizan estos sustratos directamente a su destino final (Dhar-Chowdhury *et al.*, 2007).

En plantas expuestas a la salinidad fue posible detectar un incremento en la cantidad de cuatro de las subunidades de la V-ATPasa, una involucrada en la función catalítica, dos involucradas en el ensamblado y una en la regulación del complejo. Cambios similares en la abundancia de algunas subunidades se han reportado en levadura, donde se cree que los cambios en subunidades específicas del complejo puede regular la eficiencia del montaje y/o desacoplamiento del complejo (Cipriano *et al.*, 2008). También es conocido que la V-ATPasa puede presentar diferentes conformaciones de ensamblado dependiendo del tejido, localización celular o función realizada (Alemzadeh *et al.* 2006), lo anterior lleva a pensar que ambos dominios de este complejo están en un proceso continuo de acoplamiento/desacoplamiento, desacoplados cuando no hay actividad y ensamblados para realizar su actividad.

Además, existe evidencia que las enzimas glicolíticas participan en la regulación de ciertos transportadores, por ejemplo, se ha observado que la aldolasa se une a la subunidad VHA-B de la V-ATPasa, lo cual resulta en un incremento de la actividad al aumentar su afinidad por el ATP (Barkla *et al.*, 2009). De las diez enzimas glicolíticas identificadas, cuatro registraron un aumento en su abundancia en respuesta a la salinidad (enolasa, fosfoglucomutasa, triosafosfato isomerasa y gliceraldehído 3-fosfato), lo que refuerza aún más la evidencia de la relación que tienen las enzimas glicolíticas con la tolerancia a la salinidad; esto lleva a pensar que los incrementos en estas proteínas generan cambios en los flujos de metabolitos a través de las diversas vías metabólicas, lo que puede ayudar a canalizar los metabolitos donde más se necesiten, así la célula puede mantener su homeostasis durante condiciones de estrés. En contraste con el estudio previo a este trabajo, donde se detectó un incremento en la expresión de la aldolasa (Barkla *et al.*, 2009), el análisis cuantitativo de nuestros datos no mostró un aumento significativo ($\uparrow 1.2$) en la abundancia de esta proteína por el método de conteo de espectros.

El aumento en la abundancia tanto de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, como de la enzima málica, proteínas claves en el metabolismo CAM, reflejan la adaptación metabólica de *M. crystallinum* para tolerar el estrés hídrico y salino, además reflejan la importante necesidad de la planta de optimizar el proceso de fijación de carbono y minimizar la pérdida de agua. Cabe destacar el aumento de la aspartato aminotransferasa, enzima que cataliza la reacción reversible que convierte el aspartato más el α -ketoglutarato en oxalacetato y glutamato, los cuales finalmente están relacionados con la asimilación de nitrógeno en aminoácidos, además es responsable de la regeneración de la reserva de oxalacetato requerido para el metabolismo CAM (Schultz & Coruzzi, 1995).

Durante muchos años, los intercambiadores Na^+/H^+ de la vacuola NHX1 y NHX2, han sido considerados como los mecanismos principales en la compartimentación del sodio en las vacuolas (Apse *et al.*, 1999, 2003; Blumwald *et al.*, 2000). Sin embargo, recientemente se demostró que en *Arabidopsis* AtNHX1 y AtNHX2, están

involucrados en la captación activa de K^+ , pero no en la compartimentalización de Na^+ en las vacuolas (Leidi *et al.*, 2010, Barragan *et al.*, 2012), sin embargo, en el presente trabajo no se encontró ninguna de estas proteínas. Por el contrario, resultados recientes han demostrado que en células de tabaco aclimatadas a la sal, la compartimentación subcelular de sodio en las vacuolas parece estar mediada por el tráfico vesicular, donde imágenes de microscopía muestran que la vacuola central se encuentra fragmentada en pequeñas vesículas (Garcia *et al.*, 2015). Estos resultados se podrían relacionar con el aumento en la abundancia de varias proteínas relacionadas con el tráfico vesicular, entre las que se encuentran los componentes del retrómero VPS26 y VPS35 y tres enzimas involucradas en el metabolismo de fosfoinosítidos (la inositol-4-metiltransferasa, la inositol-3-fosfato sintasa y la fosfatasa SAC3), moléculas involucradas en la señalización y transporte intracelulares. Por un lado, la inositol-4-metiltransferasa se encuentra coordinando dos procesos diferentes, se encarga de la síntesis de pinitol a partir del inositol, un soluto compatible implicado en la osmoregulación en condiciones de estrés (Nelson *et al.*, 1999). Además, en conjunto con la inositol-3-fosfato sintasa participa en la síntesis de fosfoinosítidos a partir de glucosa-6P (Ishitami *et al.*, 1996). Finalmente, la fosfatasa de fosfoinosítidos SAC3, cuyo dominio SAC exhibe actividad de fosfatasa de fosfatidilinositol, hidroliza el grupo fosfato de cualquiera de las tres posiciones del inositol que pueden ser fosforiladas (3, 4 y 5) (Zhong & Ye, 2003) y participa activamente en la interconversión de fosfoinosítidos (Odorizzi *et al.*, 2000).

Se sabe que el retrómero emplea la vía de señalización de fosfoinosítidos para transportar sus cargos correctamente a su destino final, esto lleva a pensar que la vía de transporte por medio del retrómero podría participar en la organización de vesículas donde el Na^+ podría ser secuestrado y transportado hacia la vacuola. Desafortunadamente, los datos de este análisis no muestran evidencia que uno de estos cargos sea Na^+ , no obstante, toda la evidencia presentada lleva a replantear la pregunta sobre cómo el sodio pudiera estar siendo compartimentalizado.

El aumento en la cantidad del análogo de la proteína GDAP2, al parecer implicada en el proceso de diferenciación celular, sugiere que este proceso se encuentra más

activo en plantas tratadas con sal. Al hacer un alineamiento múltiple de la secuencia de esta proteína entre distintas especies, se observaron dos dominios altamente conservados (Fig. 21A); un dominio MACRO, el cual es un módulo de aproximadamente 180 aminoácidos que pueden unirse a ADP-ribosa, metabolitos de NAD o ligandos relacionados (Hassa *et al.*, 2006) y un dominio CRALTRIO/SEC14, el cual es un dominio que se une a pequeñas moléculas lipofílicas, este dominio se encuentra en proteínas GAP (GTPase-Activating Protein) y GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factors) (Panagabko *et al.*, 2003).

La GDAP2 es inducida por gangliósidos y otros compuestos similares, los cuales son moléculas que participan en la cadena de señalización que conlleva a la diferenciación y proliferación celular (Mocchetti, 2005), sin embargo, no existe evidencia concreta sobre la función de esta proteína en plantas, pero el aumento en la cantidad de proteína causado por la salinidad merece ser investigado. Tomando como base la evidencia anterior, es posible que esta proteína forme parte de una vía de señalización que en *M. crystallinum* pudiera dar origen al desarrollo de cuerpos vesiculares que eventualmente podrían fusionarse a la vacuola, si el transporte de Na⁺ ocurre a través de este sistema, el secuestro de este catión lleva al crecimiento de la vacuola, por lo tanto, de las células vejiga donde se sabe ocurre el mayor almacenamiento de Na⁺; estas observaciones correlacionan con un estudio reciente en raíces de *Arabidopsis*, donde se observó que el estrés salino induce una vía endocítica alternativa así como la expansión de pequeños compartimentos internos para formar estructuras más grandes parecidas a las vacuolas; plantas que carecen del sistema Rab-GEF y de VPS9a son incapaces de inducir esta vía endocítica y expandir el sistema vacuolar en respuesta al estrés salino, por lo que son extremadamente sensibles a la sal (Baral *et al.*, 2015), esto lleva a pensar que la salinidad reconfigura las vías de endocitosis y remodela los sistemas de endomembranas.

Durante el proceso de anotación, se encontró que la proteína DNAJ/HSP40, la cual aumenta su abundancia en condiciones salinas, interactúa con SNX1 y VPS29, ambas parte del retrómero. La familia de proteínas DNAJ contiene una secuencia

consenso de 70 aminoácidos conocida como el dominio J. El dominio J de DNAJ/HSP40 interactúa con la familia de proteínas de choque térmico HSP70 y estimula su actividad de ATPasa (Frydman, 2001). Esta familia de proteínas también se involucra en otros procesos como la formación y organización de endosomas y endomembranas, la selección y transporte a la vacuola de diversas proteínas, además interviene en la regulación del fototropismo y del gravitropismo (Silady *et al.*, 2004). En la Figura 22, se puede observar que DNAJ interactúa por un lado con las proteínas de unión al lumen (luminal binding proteins; BIP1, BIP2 y BIP3) y la proteína de shock por calor 91 (heat shock protein 91; HSP91), que se localizan en el complejo ER-Golgi y por el otro con VPS29 y SNX pertenecientes a los complejos vesiculares, evidencia que sugiere que DNAJ/HSP40 pudiera funcionar como punto central de conexión entre estos dos grupos de proteínas coordinando la actividad del complejo retrómero.

Es difícil encontrar la razón del incremento de la (S)-2-hidroxy-ácido oxidasa, enzima implicada principalmente en la foto-respiración, catalizando la oxidación de glicolato a glioxilato, así como la oxidación de glioxilato a oxalato; sin embargo, las plantas con metabolismo CAM no realizan este proceso (Cockburn, 1985), no obstante esta enzima también puede oxidar 2-hidroxy ácidos de cadena corta, mediana y larga, compuestos derivados de la vía de la α -oxidación, un proceso donde los ácidos grasos son acortados solamente un carbono y su contribución a la producción de energía, si la hay, es desconocido. Una de las funciones de la α -oxidación parece ser la conversión de 3-metil ácidos a 2-metil ácidos, que a continuación pueden ser oxidados por las vías de β -oxidación peroxisomal y mitocondrial para generar energía (Jones *et al.*, 2000). También es posible que los ácidos grasos generados en este proceso pudieran estar dando origen a lípidos de membrana, los cuales son requeridos para el desarrollo de cuerpos vesiculares requeridos para el transporte.

El alineamiento múltiple de las secuencias del transportador MCH1 reveló que la proteína es bastante conservada en plantas, además posee un dominio altamente conservado en muchas especies, el dominio MSF (Major Facilitator Superfamily)

(Fig. 21B). La superfamilia MFS es un grupo grande y diverso de transportadores secundarios que incluye uniportadores, simportadores y antiportadores. Estas proteínas facilitan el transporte a través de las membranas de una variedad de sustratos, incluyendo iones, azúcares, neurotransmisores, aminoácidos y péptidos, empleando el potencial electroquímico de protones generado por las bombas de protones. Las proteínas MFS poseen típicamente de 400 a 600 aminoácidos y la mayoría contienen 12 hélices transmembranales (Pao *et al.*, 1998). A pesar de que este transportador está clasificado como transportador de ácidos monocarboxílicos, se conoce que su homólogo en levadura no está implicado en el transporte de estos compuestos (Makuc *et al.*, 2001). Con esta evidencia y la información disponible sobre el dominio conservado, se puede pensar que este transportador pudiera estar involucrado en el transporte de ácidos monocarboxílicos al interior de la vacuola, sin embargo, al igual que en el caso anterior se requieren estudios adicionales para validar esta idea.

El análisis de dominios de la proteína NRT1/PTR mostró una región muy conservada entre diversas especies (Fig. 21 C), denominada “proton dependent oligopeptide transporter” (POT). Este dominio está presente en una gran familia de proteínas compuesta por transportadores dependientes del potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu\text{H}^+$) y se encuentran en diversos organismos, desde las bacterias hasta los seres humanos (Paulsen & Skurray, 1994). Es probable que este transportador se encuentre introduciendo pequeños péptidos en la vacuola, los cuales posteriormente servirían para la síntesis de proteínas de almacenamiento, que estarían desempeñando la función de reservas de aminoácidos; lamentablemente debido a la poca información disponible sobre esta proteína, es difícil determinar su función específica dentro del mecanismo de tolerancia a la salinidad.

Es importante resaltar que en las fracciones aisladas de tonoplasto, fue posible identificar 12 subunidades del proteosoma, es posible que todo este complejo esté asociado a la vacuola, quizá formando una red de degradación de proteínas cerca del tonoplasto. La detección de este complejo representa una ventaja, ya que en un

futuro este podría ser enriquecido mediante FFZE para aislarlo/purificarlo, lo que facilitaría su estudio en *M. crystallinum* para así determinar si está involucrado en los mecanismos de tolerancia a la salinidad.

El aumento en la abundancia en condiciones salinas de seis proteínas, tres subunidades de la V-ATPasa: VHA-A, VHA-B, VHA-E; dos proteínas del retrómero: VPS29 y VPS35, y la PEPC esencial para el metabolismo CAM, pudo ser confirmada de manera experimental empleando ensayos de Western Blot. Los resultados de estos experimentos fueron semejantes a los obtenidos por el análisis de espectros de LC-MS/MS. En el caso de las subunidades de la V-ATPasa: la VHA-A (MS/MS: ↑1.6; WB: ↑1.9), la VHA-B (MS/MS: ↑2.1; WB: ↑3.0) y la VHA-E (MS/MS: ↑2.3; WB: ↑1.7); las proteínas del retrómero: VPS29 (MS/MS: ↑8.3; WB: ↑1.5) y VPS35 (MS/MS: ↑1.8; WB: ↑1.3); finalmente, la PEPC (MS/MS: ↑2.0; WB: ↑3.0). Los datos confirmaron el aumento de las seis proteínas en condiciones salinas, sin embargo, en el caso particular de la proteína VPS29, al comparar los resultados de ambas técnicas, la diferencia entre estas fue muy grande, posiblemente debido a que la proteína se encuentra en muy baja cantidad (sólo representa el 0.0004 % de los espectros totales) y debido a la gran sensibilidad que tiene la técnica de LC-MS/MS, es posible cuantificar cambios en la abundancia con mayor precisión, además, la especificidad del anticuerpo pudo haber influido en el resultado, ya que el anticuerpo empleado se diseñó originalmente para *AtVPS29*.

La disminución en la abundancia de un gran número de proteínas del cloroplasto y la red ER-Golgi, lleva a plantear varias posibles explicaciones; la más sencilla es que la fotosíntesis y la síntesis de proteínas son directamente afectadas por la salinidad, como consecuencia de la disminución de proteínas relacionadas con estos procesos. También, se puede considerar que el hinchamiento de la vacuola de las células vejiga en las plantas tratadas, disminuye el espacio intracelular, lo que provoca una reducción en el número de cloroplastos y en el área de la red ER-Golgi.

El uso de la biblioteca CPLL demostró algunas ventajas, en primer lugar, permitió el enriquecimiento de las proteínas de baja abundancia, concentrándolas en esta fracción; además, permitió la detección de nuevas proteínas, ampliando el rango de proteínas identificadas inicialmente; finalmente, los resultados sugieren que puede ser usada para enriquecer proteínas de membrana, ya que estas se localizan en mayor número en la fracción FT. Por el contrario, existe una gran desventaja en el uso de esta técnica. Resulta complicado realizar un análisis cuantitativo y determinar cambios en la abundancia de las proteínas, ya que para llevar a cabo esto, se debe considerar que el total de proteína inicial quedó distribuida en cinco distintas fracciones que se obtienen durante el procedimiento: las fracciones CPLL y FL, así como en los tres flijos de lavados que se realizan como parte del protocolo. De tal manera, para realizar una cuantificación global de cambios de expresión en proteínas, se debe sumar la cantidad de proteína de las cinco fracciones. Por esto, el uso de la biblioteca CPLL es apropiado para experimentos proteómicos cuyo único objetivo sea identificar proteínas cualitativamente, mientras que su uso para realizar una cuantificación es complicado y compromete la confiabilidad del análisis. En este trabajo, las fracciones correspondientes a los tres lavados no se secuenciaron por lo que no se tienen datos del contenido de proteína en estas fracciones, así que resulta imposible realizar un análisis cuantitativo de las proteínas identificadas en las fracciones del tratamiento CPLL, sin embargo, a pesar de esta limitación, la técnica permitió identificar proteínas que podrían participar en la adaptación a la salinidad.

Es necesario cambiar el enfoque con el cual se ve la salinidad para *M. crystallinum*, la planta muestra un mejor crecimiento en condiciones salinas comparado con la condición control, por lo que es la falta de sal, y no su presencia, lo que genera estrés en esta planta. La detección de ocho tipos de proteínas de almacenamiento en la fracción eluida del tratamiento CPLL de plantas tratadas con sal, es un descubrimiento importante y sugiere que el Na⁺ acelera la producción y acumulación de este tipo de proteínas dentro de la vacuola, las cuales podrían estar actuando como un sumidero para el exceso de nitrógeno derivado de la buena nutrición de la planta. Este hecho puede ser reforzado o relacionado con los resultados del análisis

proteómico de la fracción cruda del tonoplasto, donde se encontró que la abundancia del retrómero, involucrado en el transporte de proteínas de almacenamiento hacia la vacuola Shimada *et al.*, 2006), aumentó en condiciones salinas.

Por otra parte, la identificación de proteínas involucradas en la defensa (membranotoxinas, ya que se localizan en la pared celular), sugiere que las plantas que crecen en condiciones salinas poseen mecanismos adicionales de defensa; otras observaciones han identificado la abundante presencia de una proteasa de cisteína en células vejiga de plantas de *M. crystallinum* tratadas con sal, la cual posiblemente también esté involucrada en la defensa (Barkla *et al.*, 2012).

En contraste con el antecedente directo de este trabajo (Barkla *et al.*, 2009), donde se empleó la técnica 2D-DIGE para identificar proteínas relacionadas a salinidad, la cuantificación por conteo de espectros permitió incrementar la detección del número de proteínas que responden a la salinidad, ya que en total se identificaron 54, mientras que con la técnica 2D-DIGE sólo se identificaron cuatro, esto representa un incremento de más de diez veces; además, a diferencia del estudio previo donde sólo se identificaron enzimas glicolíticas y subunidades de la V-ATPasa, en el presente análisis también se encontraron proteínas relacionadas con el tráfico vesicular. Es la primera vez que se reportan estas observaciones en *M. crystallinum*, lo que lleva a replantear el modelo actual sobre los mecanismos de tolerancia a la salinidad en esta planta.

CONCLUSIONES

- La técnica de proteómica “label-free” permitió incrementar en más de diez veces el número de proteínas que responden a la salinidad en comparación con la técnica de 2D-DIGE.
- La identificación de la mayoría de las enzimas glicolíticas asociadas al tonoplasto, está de acuerdo con estudios anteriores donde también se han identificado estas enzimas asociadas a membranas.
- El aumento en la expresión de tres enzimas glicolíticas en condiciones salinas, refuerza la idea de que estas proteínas realizan funciones relacionadas con la tolerancia a la salinidad; regulando la actividad de otras proteínas como lo son las diferentes subunidades de la V-ATPasa.
- El aumento en algunas de las subunidades de la V-ATPasa bajo condiciones de estrés salino, coincide con resultados previos y confirma el importante papel de esta bomba en la tolerancia a la salinidad, al proveer el gradiente de protones requerido para el transporte intravacuolar.
- El incremento en la abundancia de enzimas del metabolismo CAM en condiciones salinas, está de acuerdo con estudios anteriores donde también se han identificado estas proteínas, además representa la inducción de este tipo de metabolismo en la planta.
- No se encontraron transportadores relacionados con la vía SOS sobre-expresados en condiciones salinas, por el contrario se identificaron proteínas relacionadas con el transporte vesicular, entre los que se encuentran los componentes del retrómero.
- El proceso de transporte vesicular está altamente activo en condiciones salinas, ya que se registró un aumento en la expresión de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de los fosfoinosítidos, compuestos que están estrechamente relacionados con el retrómero.
- La salinidad induce la producción y acumulación de proteínas de almacenamiento, ya que se identificó un gran número de estas proteínas sólo en plantas tratadas con sal.

- El Na⁺ induce mecanismos de defensa en la planta debido a la identificación de proteínas relacionadas con este proceso en plantas expuestas a la sal.
- El uso de la biblioteca CPLL aumentó el número de proteínas identificadas inicialmente.
- La biblioteca CPLL puede ser usada para enriquecer proteínas integrales de membrana.
- El uso de la biblioteca CPLL es apropiado para experimentos proteómicos cualitativos; para realizar un análisis cuantitativo no se recomienda ya se requiere la secuenciación y cuantificación por separado de todas las fracciones obtenidas durante todo el proceso.

PERSPECTIVAS

El hecho de reportar por primera vez incrementos relacionados con proteínas de tráfico vesicular en plantas de *M. crystallinum* tratadas con sal, abre varios puntos de partida para estudiar más el papel que tiene este proceso en la tolerancia a la salinidad. Los resultados obtenidos en este trabajo ayudarán a ampliar el conocimiento que se tiene sobre el proteoma de *M. crystallinum* y cómo este se comporta en condiciones de salinidad, además los datos derivados de la identificación de proteínas sirven como base para la elaboración de una colección de datos especializados en proteínas de esta halófito, la cual podría servir para futuros estudios, tanto a nivel proteómico como genómico. El presente estudio puede ser complementado con estudios de transcriptómica, para así ampliar el rango de detección de proteínas que se inducen por la salinidad, además de poder detectar posibles mecanismos de regulación. Finalmente también se abre la posibilidad a que el genoma de esta planta sea secuenciado.

REFERENCIAS

1. Adams P, Nelson DE, Yamada S, Chmara W, Jensen RG (1998) *Growth and development of Mesembryanthemum crystallinum (Aizoaceae)*. Tansley Review 97:1171-1190.
2. Agarwal PK, Shukla PS, Gupta K, Jha B (2013) *Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of art*. Molecular Biotechnology 54:102-123.
3. Alemzadeh A, Fujie M, Usami S, Yoshizaki T, Oyama K, Kawabata T, Yamada T (2006) *ZMVHA-B1, the gene for subunit B of vacuolar H⁺-ATPase from the eelgrass Zostera marina L. is able to replace vma2 in a yeast null mutant*. Bioscience Bioengineering 102:390-402.
4. Anderson NL, Anderson NG (1998) *Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words*. Electrophoresis 19:1853-1861.
5. Apel K, Hirt H (2004) *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Plant Biology 55:373-399.
6. Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) *Salt tolerance conferred by over expression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis*. Science 285:1256-1258.
7. Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E (2003) *Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter*. Plant Journal 36:229–239.
8. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology 215:403–410.
9. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B (2007) *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 389:1017-1031

10. Baral A, Irani NG, Fujimoto M, Nakano A, Mayor S, Mathewa MK (2015) *Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in Arabidopsis root*. Plant Cell 27:1297-1315
11. Barkla BJ, Zingarelli L, Blumwald E, Smith JAC (1995) *Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiology 109:549-556.
12. Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O (2007) *Enhanced separation of membranes during free flow zonal electrophoresis in plants*. Analytical Chemistry 79:5181-5187.
13. Barkla BJ, Vera-Estrella R, Hernandez-Coronado M, Pantoja O (2009) *Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance*. Plant Cell 21:4044-4058.
14. Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O (2012) *Protein profiling of epidermal bladder cells from the halophyte Mesembryanthemum crystallinum*. Proteomics 12:2862-2865.
15. Barragán V, Leidi EO, Andrés Z, Rubio L, De Luca A, Fernández JA, Cubero B, Pardo JM. (2012) *Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis*. Plant Cell 24:1127-1142.
16. Bassil E, Coku A, Blumwald E (2012) *Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development*. Journal of Experimental Botany 63:5727-5740.
17. Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, Schumaker KS, Grillo S, Zhu JK (2007) *SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity*. Molecular Cell Biology 22:7781-7790.
18. Bloom AJ (1979) *Salt requirement for crassulacean acid metabolism in the annual succulent Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiology 63: 749-753.

19. Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) *Sodium transport in plant cells*, Biochemica et Biophysica Acta 1465:140-151.
20. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) *Adaptations to environmental stresses*. Plant Cell 7:1099-1111.
21. Boschetti E, Righetti P (2008a) *The ProteoMiner in the proteomic arena: A non-depleting tool for discovering low-abundance species*. Journal of Proteomics 71:255-264.
22. Boschetti E, Righetti P (2008b) *Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues*. Biotechniques 44:663-665.
23. Bradford MM (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal of Biochemistry 72:248-254.
24. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2006) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists 1158-1170.
25. Cipriano DJ, Wang Y, Bond S, Hinton A, Jefferies KC, Qi J, Forgac M (2008) *Structure and regulation of the vacuolar ATPases*. Biochimica et Biophysica Acta 1777:599-604.
26. Cockburn W (1985) *Variation in photosynthetic acid metabolism in vascular plants: CAM and related phenomena*. New Phytologist 101:3-24.
27. Conesa A, Götz S (2008) *Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics*. International Journal of Plant Genomics 619832.
28. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) *Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research*. Bioinformatics 21:3674-3681.
29. Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC (2000) *The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research*. Electrophoresis 21:1104-1115.

30. Cotter K, Stransky L, McGuire C, Forgac M (2015) *Recent insights into the structure, regulation, and function of the V-ATPases*. Trends in Biochemical Sciences 40:611-622.
31. Cushman JC, Bohnert HJ (1992) *Salt stress alters AT-rich DNA-binding factor interactions within the phosphoenolpyruvate carboxylase promoter from Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Molecular Biology 20:411-424.
32. Cushman JC, Bohnert HJ (1989) *Nucleotide sequence of the gene encoding a CAM specific isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase from Mesembryanthemum crystallinum*. Nucleic Acids Research 7:6745-6746.
33. Cushman JC, Bohnert HJ (1999) *Crassulacean acid metabolism: molecular genetics*. Plant Molecular Biology 50:305-332.
34. Dhar-Chowdhury P, Malester B, Rajacic P, Coetzee WA (2007) *The regulation of ion channels and transporters by glycolytically derived ATP*. Cellular and Molecular Life Sciences 64:3069-3083.
35. Deinlein U, Stephan A, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder J (2014) *Plant salt-tolerance mechanisms*. Trends Plant Science 19:371-379.
36. Dhingraa V, Gupta M, Andach T, Fu ZF (2005) *New frontiers in proteomics research: A perspective*. International Journal of Pharmaceutics 299:1-18
37. Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC, Chardonens AN, Gollack D (2001) *Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level*. Journal of Experimental Botany 52:1969-80.
38. Drory O, Nelson N (2006) *The emerging structure of vacuolar ATPases*. Plant Physiology 21:317-325.
39. Eubel H, Lee CP, Kuo J, Meyer EH, Taylor NL, Millar AH (2007) *Free-flow electrophoresis for purification of plant mitochondria by surface charge*. Plant Journal 52:583-594.

40. Fernie AR, Leaver CJ, Sweetlove LJ (2003) *Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells*. Plant Cell 15:2140-2151.
41. Flowers T, Colmer T (2008) *Salinity tolerance in halophytes*. Plant Physiology 179:945-963.
42. Flowers TJ, Yeo AR (1995) *Breeding for salinity resistance in crop plants: where next?*. Journal of Plant Physiology 22:875-884.
43. Foyer CH, Harbison J (1994) *Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants*. Editor Foyer 1-42.
44. Foyer CH, Noctor G (2009) *Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications*. Antioxidants & Redox Signaling 11:861-905.
45. Fröhlich A, Gaupels F, Sarioglu H, Holzmeister C, Spannagl M, Durner J, Lindermayr C (2012) *Looking deep inside: detection of low-abundance proteins in leaf extracts of Arabidopsis and phloem exudates of pumpkin*. Plant Physiology 159:902-914.
46. Frydman J (2001) *Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones*. Annual Review of Biochemistry 70:603-647.
47. Garciadeblas B, Senn ME, Banuelos MA, Rodriguez-Navarro (2003) *A sodium transport and HKT transporters: the rice model*. Plant Journal 34:788-801.
48. Garcia de la Garma J, Fernandez-Garcia N, Bardisi E, Pallol B, Asensio-Rubio JS, Bru R, Olmos E (2015) *New insights into plant salt acclimation: the roles of vesicle trafficking and reactive oxygen species signalling in mitochondria and the endomembrane system*. New Phytologist 205:216-239.
49. Givan CV (1980) *Aminotransferases in higher plants*. The Biochemistry of Plants 5:329-357.
50. Gluck SL (1992) *V-ATPases of the plasma membrane*. Journal of Experimental Biology 3:29-37.

51. Greenway H, Munns R (1980) *Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes*. Plant Physiology 31:149-190.
52. Gutterman Y (1980) *Annual rhythm and position effect in the germinability of Mesembryanthemum crystallinum*. Israel Journal of Botany 29:93-97.
53. Hamdy A, Choukr-Allah R, Hamdy A (1996) *Halophytes and Biosaline Agriculture* 1:34-56.
54. Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C, Richter J, Rubin GM, Blake JA, Bult C, Dolan M, Drabkin H, Eppig JT, Hill DP, Ni L, Ringwald M, Balakrishnan R, Cherry JM, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel S, Fisk DG, Hirschman JE, Hong EL, Nash RS, Sethuraman A, Theesfeld CL, Botstein D, Dolinski K, Feierbach B, Berardini T, Mundodi S, Rhee SY, Apweiler R, Barrell D, Camon E, Dimmer E, Lee V, Chisholm R, Gaudet P, Kibbe W, Kishore R, Schwarz EM, Sternberg P, Gwinn M, Hannick L, Wortman J, Berriman M, Wood V, de la Cruz N, Tonellato P, Jaiswal P, Seigfried T, White R (2004) *The Gene Ontology (GO) database and informatics resource*. Nucleic Acids Research D258-61.
55. Hasegawa PM, Bressan, RA, Zhu JK., Bohnert HJ (2000) *Plant cellular and molecular responses to high salinity*. Plant Physiology 51:463-499.
56. Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO (2006) *Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 70:789-829.
57. Hirshi KD, Zhen RG, Rea PA, Fink GR (1996) *CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from Arabidopsis*. PNAS 93:8782-8786
58. Hoagland DR (1950) *The water-culture method for growing plants without soil*. Circ. 347. Univ. of Calif. Agric. Exp. Station, Berkley.
59. Huang S, Spielmeier W, Lagudah ES, Munns R (2008) *Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na⁺ transport and salt tolerance*. Journal of Experimental Botany 59:927-935.

60. Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ (1996) *Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress*. *Plant Journal* 9:537-548.
61. Issaq HJ, Veenstra TD (2008) *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives*. *Biotechniques* 44:697-700.
62. Jesper V, Mann M (2004) *Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation*. *PNAS* 101:13417-13422.
63. Ji H, Pardo JM, Batelli G, Oosten MJV, Bressan RA, Li X (2013) *The salt overly sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles*. *Molecular Plant* 6:275-286.
64. Johnson RG, Beers MF, Scarpa A (1982) *H⁺-ATPase of chromaffin granules. Kinetics, regulation, and stoichiometry*. *Journal of Biological Chemistry* 257:10701-10707.
65. Jones JM, Morrell JC, Gould SJ (2000) *Identification and characterization of HAOX1, HAOX2, and HAOX3, three human peroxisomal 2-hydroxy acid oxidases*. *Journal of Biology and Chemistry* 275:12590-12597.
66. Jouyban Z (2012) *The effects of Salt stress on plant growth*. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences* 2:7-10.
67. Käll L, Krogh G, Sonnhammer E (2004) *A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method*. *Journal of Molecular Biology* 338:1027-1036.
68. Keidel EM, Ribitsch D, Lottspeich F (2010) *Equalizer technology: equal rights for disparate beads*. *Proteomics* 10:2089-2098.
69. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R (2002) *Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search*. *Analytical Chemistry* 74:5383-92.
70. Lee CP, Eubel H, O'Toole N, Millar AH (2008) *Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic Arabidopsis metabolism*. *Molecular Cell Proteomics* 7:1297-1316.

71. Leidi EO, Barragan V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz T, Cubero B (2010) *The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato*. Plant Journal 61:495-506.
72. Li M, Gray W, Zhang H, Chung CH, Billheimer D, Yarbrough WG, Liebler DC, Shyr Y, Slebos RJC (2010) *Comparative shotgun proteomics using spectral count data and quasi-like likelihood modelling*. Journal of Proteome Research 9:4295-4305.
73. Lindqvist Y, Braenden CI (1989) *The active site of spinach glycolate oxidase*. Journal of Biological Chemistry 264:3624-3628.
74. Liu H, Nakagawa T, Kanematsu T, Uchida T, Tsuji S (1999) *Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene*. Journal of Neurochemistry 72:1781-1790.
75. Lüttge U (1993) *The role of Crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity*. New Phytologist 125:59-71.
76. Maas EV, Grattan SR (1999) *Crop yields as affected by salinity*, Agronomic Monograph 2:55-108.
77. Maeshima M (2000) *Vacuolar H⁺-pyrophosphatase*. Biochimica et Biophysica Acta 30:174-180.
78. Makuc J, Paiva S, Schauen M, Krämer R, André B, Casal M, Leão C, Boles E (2001) *The putative monocarboxylate permeases of the yeast Saccharomyces cerevisiae do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane*. Trends in Biochemical Sciences 18:1131-43.
79. Millar AH, Eubel H, Jänsch L, Kruff V, Heazlewood JL, Braun HP (2004) *Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits*. Plant Molecular Biology 56:77-90.
80. Mocchetti I (2005) *Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins*. Cell Molecular Life Sciences 62:2283-2294.
81. Munns R (2005) *Genes and salt tolerance: bringing them together*. New Phytologist 167:645-663.

82. Munns R, Tester M (2008) *Mechanisms of salinity tolerance*. Plant Biology 59:651-681.
83. Nelson DE, Koukoumanos M, Bohnert HJ (1999) *Myo-inositol-dependent sodium uptake in ice plant*. Plant Physiology 119:165-172.
84. Niu, X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995) *Ion homeostasis in NaCl stress environments*. Plant Physiology 109:735-742.
85. Núñez-Ramírez R, Sánchez-Barrena MJ, Villalta I, Vega JF, Pardo JM, Quintero FJ (2012) *Structural insights on the plant salt-overly-sensitive 1 (SOS1) Na⁺/H⁺ antiporter*. Journal of Molecular Biology 424:283-294.
86. Odorizzi G, Babst M, Emr S (2000) *Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast*. Trends in Biochemical Sciences 25:229-235.
87. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L (2005) *Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics*. Molecular and Cellular Proteomics 10:1487-1502.
88. Oliviusson P, Heinzerling O, Hillmer S, Hinz G, Tse YC, Jiang L, Robinson DG (2006) *Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in Arabidopsis, may interact with vacuolar sorting receptors*. Plant Cell 18:1239-52.
89. Panagabko C, Morley S, Hernandez M, Cassolato P, Gordon H, Parsons R, Manor D, Atkinson J (2003) *Ligand Specificity in the CRAL-TRIO Protein Family*. Biochemistry 42:6467-6474.
90. Pandey GK (2008) *Emergence of a novel calcium signaling pathway in plants: CBL-CIPK signaling network*. Physiology and Molecular Biology of Plants 14:51-68.
91. Pang JX, Ginanni N, Dongre AR, Hefta SA, Opiteck GJ (2002) *Biomarker discovery in urine by proteomics*. Journal of Proteome Research 2:161-169.
92. Pang QY, Chen SX, Dai SJ, Chen YZ, Wang Y, Yan XF (2010) *Comparative proteomics of salt tolerance in Arabidopsisthaliana and Thellungiella halophila*. Journal of Proteome Research 9:2584-99.

93. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH J (1998) *Major facilitator superfamily*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62:1-34.
94. Parsons HT, Christiansen K, Knierim B, Carroll A, Ito J (2012) *Isolation and proteomic characterization of the Arabidopsis Golgi defines functional and novel components involved in plant cell wall biosynthesis*. Plant Physiology 159:12-26.
95. Patel VJ, Thalassinos K, Slade SE (2009) *A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches*. Journal of Proteome Research 7:3752-3759.
96. Paulsen IT, Skurray RA (1994) *Proton-dependent multidrug efflux systems*. Microbiology Reviews 60:575-608.
97. Qiu QS, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Zhu JK, Schumaker K (2003) *Na⁺/H⁺ exchange activity in the plasma membrane of Arabidopsis*. Plant Physiology 132:1041-1052.
98. Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L (2006) *The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones*. Cellular and Molecular Life Sciences 63:2560-70.
99. Quan R, Lin H, Mendoza I, Zhang Y, Cao W, Yang Y (2007) *SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress*. Plant Cell 19:1415-1431.
100. Quintero FJ, Martinez-Atienza J, Villalta I, Jiang X, Kim WY, Ali Z (2011) *Activation of the plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter salt-overly-sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain*. PNAS 108:2611-2616
101. Rabilloud T (2009) *Membrane proteins and proteomics: Love is possible, but so difficult*. Electrophoresis 30:174-180.
102. Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M (2002) *Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome*. Genome Research 8:1231-1245.

103. Ratajczak R (2000) *Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:17-36.
104. Righetti G, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E (2005) *Prefractionation techniques in proteome analysis: The mining tools of the third millennium*. *Electrophoresis* 26:297-319.
105. Righetti P, Boschetti E (2008) *The ProteoMiner and the FortyNiners: Searching for gold nuggets in the proteomic arena*. *Mass Spectrometry Reviews* 27:596-608.
106. Rhoades JD, Loveday J (1990) *Salinity in irrigated agriculture*, *Agronomy* 30:1089-1142.
107. Rodríguez-Navarro A, Rubio F. 2006. *High-affinity potassium and sodium transport systems in plants*. *Journal of Experimental Botany* 57:1149-1160.
108. Rodríguez-Rosales MP, Gálvez FJ, Huertas R, Aranda MN, Baghour M, Cagnac O (2009) *Plant NHX cation/proton antiporters*. *Plant Signal* 4:265-276.
109. Rosas-Santiago P, Lagunas-Gomez D, Barkla BJ, Vera-Estrella R, Lalonde S, Jones A, Frommer WB, Zimmermannova O, Sychrova H, Pantoja O (2015) *Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter OsHKT1;3*. *Journal of Experimental Botany* 66:2733-2748.
110. Salisbury FB, Ross CW (1992) *Plant Physiology*. *Annals of Botany* 575-590.
111. Schachtman DP (2000) *Molecular insights into the structure and function of plant K⁺ transport mechanisms*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:127-139.
112. Schultz C, Coruzzi G (1995) *The aspartate aminotransferase gene family of Arabidopsis encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments*. *Plant Journal* 7:61-75.

113. Schmidt, U.G., Endler, A., Schelbert, S., Brunner, A., Schnell, M., Neuhaus, H.E., Marty-Mazars, D., Marty, F., Baginsky, S., Martinoia, E. (2007). *Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds*. *Plant Physiology* 145:216-229.
114. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nature Methods* 9:671-675.
115. Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000) *The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter*. *PNAS* 35:6896-6901.
116. Shewry P, Napier J, Tatham A (1995) *Seed storage proteins: structures and biosynthesis*. *Plant Cell* 7:945-956.
117. Shimada T, Koumoto Y, Li L, Yamazaki M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2006) *AtVPS29, a putative component of a retromer complex, is required for the efficient sorting of seed storage proteins*. *Plant Cell Physiology* 47:1187-1194.
118. Sigg J (1981) *Native plant survivors in San Francisco parks: Mesembryanthemum and Erysimum franciscanum*. *California Native Plant Society* 9:15.
119. Silady RA, Kato T, Lukowitz W, Sieber P, Tasaka M, Somerville CR (2004) *The gravitropism defective 2 mutants of Arabidopsis are deficient in a protein implicated in endocytosis in Caenorhabditis elegans*. *Plant Physiology* 136:3095-3103.
120. Somero N, Yancey P (1997) *Osmolytes and cell-volume regulation: physiological and evolutionary principles*. *Handbook of Physiology* 14-23.
121. Stitt M, Lunn J, Usadel B (2010) *Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism: more than the icing on the cake*. *Plant Journal* 61:1067-1091
122. Sykes SR (1992) *The inheritance of salt exclusion in woody perennial fruit*. *Plant and Soil* 197:123-129.

123. Sze H, Schumacher K, Muller ML, Padmanaban S, Taiz L (2002) *A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase*, Trends in Plant Science 7:157-161.
124. Sze H, Ward JM, Lai S, Perera I (1992) *Vacuolar-type H⁺-translocating ATPase in plant endomembranes: subunit organization and multigene family*. Journal of Experimental Biology 172:123-135.
125. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2015) *STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life*. Nucleic Acids Research D447-52.
126. Tonge R, Shaw J, Middleton B (2001) *Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology*. Proteomics 1: 377-96.
127. Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007) *Nitrate transporters and peptide transporters*. FEBS Letters 581:2290-2300.
128. Tsiantis MS, Bartholomew DM, Smith JAC (1996) *Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H⁺-ATPase in the halophyte Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Journal 9:729-736.
129. Umena Y, Kawakami K, Shen JR, Kamiya N (2011) *Crystal Structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 angstroms*. Nature 473:55-60.
130. Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A (2000). *The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in Xenopus laevis oocytes and Na⁺ uptake in Saccharomyces cerevisiae*. Plant Physiology 122:1249-1259.
131. Vera-Estrella R, Barkla BJ, García-Ramírez L, Pantoja O (2005) *Salt stress in Thellungiella halophila activates Na⁺ transport mechanisms required for salinity tolerance*. Plant Physiology 139:1507-1517.
132. Vera-Estrella R, Barkla BJ, Pantoja O (2014) *Comparative 2D-DIGE analysis of salinity responsive microsomal proteins from leaves of salt-*

- sensitive Arabidopsis thaliana and salt-tolerant Thellungiella salsuginea*. Journal of Proteomics 111:113-127.
133. Verslues PE, Batelli G, Grillo S, Agius F, Kim YS, Zhu J, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu JK (2007) *Interaction of SOS2 with NDPK2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H₂O₂ signaling in Arabidopsis*. Molecular and Cellular Biology 27:7771-7780.
134. Waters S, Gilliam M, Hrmova M (2013) *Plant High-Affinity Potassium (HKT) Transporters Involved in Salinity Tolerance: Structural Insights to Probe Differences in Ion Selectivity*. International Journal of Molecular Sciences 14:7660-7680.
135. Weber G, Wildgruber R (2008) *Free-flow electrophoresis system for proteomics applications*. Methods of Molecular Biology 384:703-716.
136. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF (1996) *From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis*. Nature Biotechnology 14:61–65.
137. Winter K, von Willert DJ (1972) *NaCl-induzierter Crassulace ensaurestoffwechsel bei Mesembryanthemum crystallinum*, Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenfruchtbarkeit 67:166-170.
138. Winter K (1978) *Phosphoenolpyruvate carboxylase from Mesembryanthemum crystallinum: its isolation and inactivation in vitro*, Journal of Experimental Botany 29:539-546.
139. Wu SJ, Ding L, Zhu JK (1996) *SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition*. Plant Cell 8:617-627.
140. Xu H, Jiang X, Zhan K, Cheng X, Chen X, Pardo JM (2008) *Functional characterization of a wheat plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter in yeast*. Archives of Biochemistry and Biophysics 473:1508-1512.
141. Yamaguchi T, Apse MP, Shi H, Blumwald E (2003) *Topological analysis of a plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity*. PNAS 100:12510-12515

142. Yokoi S, Ray AB, Hasegawa PM (2002) *Salt Stress Tolerance of Plants*. JIRCAS Working Report 25-33.
143. Zhong R, Ye ZH (2003) *The SAC domain-containing protein gene family in Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132:544-555.
144. Zhu JK (2001) *Plant salt tolerance*. *Trends in Plant Science* 2:66-71.
145. Zhu W, Smith J, Huang CM (2010) *Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 840518.